

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin

**Vliv podmínek při biologickém čištění odpadní vody na aktivitu
nitrifikačních organismů**

.....
doktorská disertační práce

Autor: Ing. Helena Radechovská

Školitel: prof. Ing. Jiří Balík, CSc., dr. h. c.

Konzultant: Ing. Pavel Švehla, Ph.D., FAPPZ ČZU v Praze

Praha 2 0 2 4

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem doktorskou disertační práci na téma: „Vliv podmínek při biologickém čištění odpadní vody na aktivitu nitrifikačních organismů“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příloženém seznamu literatury.

V Praze dne

Podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala prof. Ing. Jiřímu Balíkovi, CSc., dr. h. c. za laskavé vedení a lidský přístup a Ing. Pavlu Švehlovi, Ph.D. za odborné rady a připomínky při psaní této práce. Dále děkuji všem členům Katedry agroenvironmentální chemie a výživy rostlin za vytvoření příjemného pracovního prostředí. A v neposlední řadě děkuji svému manželovi a svým synům, že mi byli oporou.

Věnování

Tuto práci bych ráda věnovala mamince a babičce, protože mě ve studiu podporovaly a nyní už se na mě mohou dívat jen z nebe.

Obsah

1 LITERÁRNÍ PŘEHLED	1
1. 1 DUSÍK VE VODNÍM PROSTŘEDÍ	1
1. 2 DŮVODY ODSTRAŇOVÁNÍ DUSÍKU Z OV	1
1. 3 ODSTRAŇOVÁNÍ DUSÍKU Z ODPADNÍCH VOD	3
1. 3. 1 Fyzikálně-chemické postupy	3
1. 3. 2 Biologické postupy	5
1. 3. 2. 1. Nitrifikace a denitrifikace.....	5
1. 3. 2. 1. 1 Nitrifikace.....	5
1. 3. 2. 1. 2. Denitrifikace	6
1. 3. 2. 2. Netradiční biologické postupy.....	7
1. 3. 2. 2. 1. Nitritace/denitritace	8
1. 3. 2. 2. 2. Deamonifikace.....	10
1. 4. FAKTORY VYUŽITELNÉ K POTLAČENÍ FUNKCE NOB PŘI SOUČASNÉM ZACHOVÁNÍ FUNKCE AOB	13
1. 4. 1. Koncentrace rozpuštěného kyslíku.....	13
1. 4. 2. Teplota.....	15
1. 4. 3. Stáří kalu.....	15
1. 4. 4. Hodnota pH	16
1. 4. 5. Koncentrace FA a FNA	16
1. 4. 6. Způsob kultivace biomasy	18
1. 4. 7. Další faktory	19
1.5. KALOVÁ VODA A JEJÍ ZPRACOVÁNÍ	21
1. 6. SHRNTÍ	24
2 CÍLE A HYPOTÉZA	25
3 PUBLIKOVANÉ PRÁCE.....	26
3. 1. PUBLIKOVANÁ PRÁCE Č. 1.....	26
3. 2. PUBLIKOVANÁ PRÁCE Č. 2.....	32
3. 3. PUBLIKOVANÁ PRÁCE Č. 3.....	42
3. 4. PUBLIKOVANÁ PRÁCE Č. 4.....	56
4. SUMÁRNÍ DISKUZE.....	69
4. 1. ZKRÁCENÁ NITRIFIKACE PŘI NÍZKÉ TEPLITĚ A PROMĚNLIVÉ VSTUPNÍ KONCENTRACI N-AMON	71
4. 2. ZKRÁCENÁ NITRIFIKACE PŘI RŮZNĚ INTENZIVNÍCH TEPLITNÍCH VÝKYVECH.....	75
4. 3. ZKRÁCENÁ NITRIFIKACE PŘI TEPLITNÍCH VÝKYVECH A MĚNÍCÍM SE ZATÍŽENÍ REAKTORU N-AMON	78
4. 4. ADAPTACE NITRIFIKAČNÍCH ORGANISMŮ NA VYSOKÉ KONCENTRACE FA A FNA	78
4. 4. 1. Adaptace AOB.....	78
4. 4. 2. Adaptace NOB.....	80
4. 5. VÝZNAM ZÍSKANÝCH POZNATKŮ PRO PRAXI.....	81
5 ZÁVĚR.....	85
6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	87

1 Literární přehled

1.1 Dusík ve vodním prostředí

Dusík je jeden z nejdůležitějších makrobiogenních prvků. Ve vodách stanovujeme celkový dusík (N-celk), který se dělí na anorganicky (N-anorg) a organicky (N-org) vázaný. Mezi hlavní formy anorganicky vázaného dusíku patří amoniakální, dusitanový a dusičnanový dusík. Dusitany a dusičnany patří k tzv. oxidovaným formám dusíku a jejich suma se označuje jako celkový oxidovaný dusík (Pitter 2009).

1.2 Důvody odstraňování dusíku z OV

Dusík je významný nutrient a má nezastupitelnou roli v řadě přírodních procesů, přesto je nezbytné, aby byl odstraňován z odpadních vod, protože jeho zvýšené koncentrace ve vodách jsou nežádoucí z řady důvodů.

Amoniakální dusík má vysokou spotřebu kyslíku na svou biochemickou oxidaci (Chudoba et al. 1991) a nedisociovaná molekula NH_3 působí toxicky na ryby, jelikož poměrně snadno proniká buněčnými membránami (Pitter 2009). Dusitany jsou toxické pro ryby, v kyselém prostředí gastrointestinálního traktu živočišných organismů se předpokládá možnost transformace dusitanů na potencionálně karcinogenní N-nitrosoaminy (Pitter 2009). Nebezpečné jsou také vyšší koncentrace dusičnanů v pitných vodách. Dusičnany jsou sice samy o sobě pro člověka málo škodlivé, ale jejich nebezpečí tkví v tom, že se v gastrointestinálním traktu snadno redukuje bakteriální činností na toxičtější dusitany. Ty pak mohou způsobit methemoglobinemii, kdy dusitany reagují s hemoglobinem na methemoglobin, který nemá schopnost přenášet v krvi kyslík. Toto onemocnění je nebezpečné zvláště pro kojence (Greer & Shannon 2005; Pitter 2009). Konzumace vody se zvýšeným obsahem dusičnanů je riziková také pro těhotné ženy, protože může způsobit např. předčasný porod nebo poškození či úmrtí plodu (Ward et al. 2005). Dusičnany mohou být také prekurzory potenciálně karcinogenních N-nitrosoaminů (Pitter 2009).

Kvůli relativnímu nedostatku sloučenin dusíku v některých částech světa a poměrně velké energetické náročnosti získávání dusíku pro výrobu dusíkatých hnojiv, se

v současnosti dostává do popředí otázka získávání dusíku z odpadních vod, který by se dal dále využít (Winkler & Straka 2019). Jako perspektivní se v tomto ohledu jeví především fyzikálně-chemické metody odstraňování dusíkatých sloučenin - viz kapitola 1. 3. 1.

Sloučeniny dusíku se také společně se sloučeninami fosforu významně podílí na eutrofizaci vod, proces je vzhledem ke své významnosti podrobněji popsán v následující podkapitole.

1. 2. 1 Eutrofizace vod

Eutrofizace je růst obsahu minerálních živin (zejména sloučenin fosforu a dusíku) ve stojatých a tekoucích vodách, který následně vyvolá růst biomasy autotrofních organismů, tj. sinic, řas a některých vyšších rostlin (Pitter 2009). V první fázi vytvoří převážně drobné planktonní řasy opticky homogenní suspenzi, která je označována jako tzv. vegetační zbarvení vody, později dochází ke vzniku tzv. vodního květu, což jsou okem patrné shluky koloniálních či vláknitých sinic, někdy i řas na vodní hladině. Při vysokém zatížení živinami pak dochází k rozvoji rychle rostoucích vláknitých řas, jindy převládne vyšší vodní vegetace (Ambrožová 2003; Pitter 2009).

Výše popsáný rozvoj fytoplanktonu má následně vliv na řadu fyzikálních, chemických a organoleptických vlastností vody i na samotné organismy. Následkem toho může být snížena možnost rybářského, rekreačního či vodárenského využití vod (Cai et al. 2013; Hwang 2020). Dochází k narušení biodiverzity společenstev a vlivem snížené průhlednosti vod a mikrobiálního rozkladu velkého množství odumřelých řas a sinic je negativně ovlivněn také kyslíkový režim. Eutrofizace vede také k porušení uhličitanové rovnováhy ve vodách a zvýšení pH až do hodnoty 10, tím pádem se zvyšuje i koncentrace nedisociované formy amoniakálního dusíku toxického pro ryby (Pitter 2009). Celý proces s sebou samozřejmě přináší také zdravotní rizika pro člověka – např. toxiny sinic, tzv. cyanotoxiny, mohou u citlivějších osob vyvolat nejrůznější negativní reakce jako alergie, průjem, zvracení, bolesti hlavy, podráždění kůže ad. (Ambrožová 2003; Pitter 2009; Dittmann et al. 2013; Hwang 2020).

Je důležité uvést, že eutrofizace je přírodní děj, který pouze v důsledku lidské činnosti přesáhl přirozené meze a v současnosti negativně ovlivňuje kvalitu vody na celém

světě (Jin et al. 2019; Preisner et al. 2020). Tzv. antropogenní eutrofizace vzniká především v důsledku přísunu živin z odpadních vod a z hnojiv a jejich výluhů (Bhagowati & Ahamad 2019). Při boji s eutrofizací je v první řadě nutno omezit přísun živin z okolního prostředí. Jednou z možností, jak toho docílit, je odstraňování dusíku a fosforu z odpadních vod. Při hledání optimální technologie odstraňování těchto nutrientů je ale potřeba brát v potaz obsah živin přímo biologicky dostupných pro vodní vegetaci, ne pouze celkový obsah těchto živin, v opačném případě totiž nemusí nákladná moderní technologie zajistit účinnou ochranu před eutrofizací (Preisner et al. 2020).

1.3 Odstraňování dusíku z odpadních vod

Metody odstraňování dusíku dělíme na biologické a fyzikálně-chemické. Přes velký vývoj fyzikálně-chemických postupů jsou v praxi stále nejvíce využívány metody biologické.

1.3.1 Fyzikálně-chemické postupy

Fyzikálně-chemických metod je velké množství, mezi nejčastěji využívané řadíme např. stripování vzduchem, vysrážení ve formě fosforečnanu hořečnato-amonného, adsorpci nebo zachycování na měničích iontů.

Pro aplikaci metody stripování je nejprve nutné zvýšit pH čištěné vody na hodnotu přibližně mezi 10 - 12, aby došlo k přeměně většiny amonného iontu do těkavé formy NH_3 , kterou je možné odstranit proudem čistícího plynu (Rahimi et al. 2020). Celý proces má vysokou separační účinnost, a pokud je amoniak za zvýšené teploty stripován párou, dochází k zachycení kapalného kondenzátu, který může být přeměněn na síran amonný využívaný jako hnojivo (Kundu et al. 2022). Do čištěné vody je ale obvykle nutno dodávat chemikálie pro úpravu hodnoty pH, nejčastěji hydroxid sodný nebo hydroxid vápenatý. Celý proces je poměrně energeticky náročný a přináší také řadu provozních problémů – je např. nutné čistit stripovací plyn, aby nevzniklo nebezpečí znečištění ovzduší amoniakem, který by se zpětně vracel do vod srážkovou činností. Dalším problémem je hluk způsobený např. chodem motoru či ventilátoru a tvorba povlaku MgCO_3 či CaCO_3 daná přítomností CO_2 ve vzduchu (Chmielewska 2005; Perera et al. 2019).

Další možností odstranění dusíku z odpadních vod je vysrážení ve formě struvitu, tedy fosforečnanu hořečnatu – amonného ($(\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O})$), k čemuž se nejčastěji využívá např. MgO a H_3PO_4 (Chmielewská 2005; Li et al. 2019; Achilleos et al. 2022). Vysrážená sůl se dá využít např. jako hnojivo nebo stavební materiál, ale aby mohl proces uspokojivě probíhat, musí být do čištěné vody ve většině případů přidáván fosfor kvůli úpravě látkového poměru N:P, ten je ale rovněž významným nutriem odstraňovaným z odpadních vod. Celý postup je také v případě vysokého obsahu amoniakálního dusíku v čištěné vodě obvykle nutno kombinovat s jinými metodami, např. adsorpcí (Chmielewská 2005; Li et al. 2019).

Při adsorpci dochází k zachycení částic z čištěné vody na porézním adsorbentu, na jehož povrchu se hromadí. Takovým adsorbentem jsou v praxi nejčastěji zeolity, křemelina nebo biochar (biouhel), což jsou materiály s velkým specifickým povrchem (Khamidun et al. 2020). Další perspektivní metodou je zachycování na měničích iontů, při němž dochází k výměně N-amon s výměnným kationtem na ionexu (Mehta et al. 2015; Perera et al. 2019). Obě výše uvedené metody lze využít k získání živin a jejich následnému využití jako hnojiva, nicméně obě jsou většinou spjaty se spotřebou chemických látek na regeneraci ionexů či adsorbentů (Beckinghausen et al. 2020; Pinelli et al. 2022).

Za zmínku stojí jistě i fotokatalytická oxidace, během níž dochází k oxidaci N-amon na dusitany díky světlu a fotokatalyzátoru, kterým je nejčastěji oxid titaničitý (TiO_2). Celý proces se obejde bez provzdušňování čištěné vody, nedochází při něm k emisím oxidu dusného, ale prozatím je z ekonomického hlediska nákladný a mohou při něm vznikat různé toxické vedlejší produkty (Ren H.-T. et al. 2020; Zhao et al. 2022).

Jak vyplývá z předcházejícího textu, fyzikálně-chemické metody představují lákavou možnost, jak získat dusík k dalšímu využití, na rozdíl od biologických postupů, které jej v zásadě pouze odstraňují. Z výše uvedených důvodů, především kvůli vysoké spotřebě nejrůznějších chemikálií, což způsobuje nárůst provozních nákladů a představuje i riziko vnášení cizorodých látek do zpracovávané vody, je ale jejich širší využití v praxi prozatím omezené.

1. 3. 2 Biologické postupy

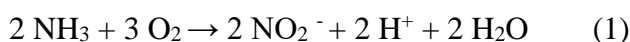
Tradičním způsobem odstranění dusíku z odpadních vod je využití nitrifikace a následné denitrifikace, kvůli nesporným výhodám se ale do popředí dostávají také nejrůznější netradiční metody. K jejich optimalizaci a většímu využití v praxi se snaží přispět i tato práce.

1. 3. 2. 1. Nitrifikace a denitrifikace

Konvenční biologické odstraňování anorganického dusíku spočívá v biochemické oxidaci amoniakálního dusíku na dusitany a dusičnany (nitrifikace) a v denitrifikaci, tedy jejich následné biochemické redukci na plynný dusík (Chudoba a kol. 1991; Gonzalez-Martinez et al. 2018).

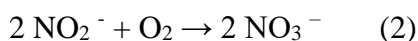
1. 3. 2. 1. 1 Nitrifikace

Nitrifikace je oxidace amoniakálního dusíku ve dvou krocích. Nejprve je amoniakální dusík oxidován na dusitany (nitritace), což je popsáno následující rovnicí:



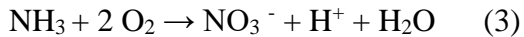
Reakce je katalyzována monooxygenázou amoniaku (AMO – ammonia monooxygenase) a hydroxylaminoxidoreduktázou (HAO – hydroxylamine oxidoreductase) za vzniku hydroxylaminu (NH_2OH) jako meziprojektu a je zabezpečena např. bakteriemi rodů *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosocystis*, *Nitrosovibrio* a *Nitrosolobus* (Chudoba a kol. 1991; Rahimi et al. 2020), které jsou v anglicky psané literatuře souhrnně označovány jako AOB, tedy Ammonia Oxidising Bacteria (Blackburne et al. 2008; Rahimi et al. 2020).

Následně jsou dusitany oxidovány na dusičnany (nitratice) podle rovnice:



Tento proces zajišťují např. bakterie rodů *Nitrobacter*, *Nitrocystis*, *Nitrospina*, *Nitrospira* a *Nitrococcus* (Chudoba a kol. 1991; Ahn 2006), jež označujeme jako NOB, tedy Nitrite Oxidising Bacteria (Blackburne et al. 2008; Rahimi et al. 2020).

Sumární rovnici nitrifikace je tedy možno zjednodušeně zapsat jako:



K úplné oxidaci 1 g amoniakálního dusíku se teoreticky spotřebuje celkem 4,57 g kyslíku, energie uvolněná při nitrifikaci je však využita k syntéze nové biomasy nitrifikačních organismů, při níž se část amoniakálního dusíku spotřebuje, takže je spotřeba kyslíku menší, udává se cca 4,33 g na úplnou nitrifikaci 1 g amoniakálního dusíku. Dále je patrné, že při nitrifikaci dochází k uvolňování vodíkových iontů H^+ , které okyselují prostředí. Dochází ke snižování KNK (kyselinová neutralizační kapacita, tj. množství jednosytné silné kyseliny potřebné k dosažení určité hodnoty pH sledované vody) a při její nízké hodnotě a vysoké koncentraci N-amon je třeba, pokud současně nedochází k denitrifikaci, přidávat neutralizační činidlo, nejčastěji $\text{Ca}(\text{OH})_2$. V důsledku snížení hodnoty pH by totiž mohlo dojít ke zpomalení či zastavení procesu nitrifikace, případně dalších biochemických čistírenských procesů (Chudoba a kol. 1991; Pitter 2009).

Nitrifikace je zajištěna chemolitotrofními organismy, které jsou schopny růst bez organických látek, jako zdroj uhlíku využívají oxid uhličitý a jako zdroj energie oxidaci dusíku. Zároveň nitrifikační bakterie patří mezi aerobní organismy, které využívají kyslík jako akceptor elektronů při oxidaci amoniakálního a dusitanového dusíku. Množství získané energie je však malé a pro nitrifikační bakterie je proto charakteristická malá specifická tvorba nové biomasy (Chudoba a kol. 1991; Pitter 2009; Englande et al. 2015).

V nedávné době byla v rámci rodu *Nitrospira* objevena přítomnost mikroorganismů (tzv. comammox), které jsou schopny úplné přeměny amoniakálního dusíku až na dusičnany (Daims et al. 2015) a je snaha využít tohoto poznatku pro optimalizaci odstraňování dusíkatého znečištění z odpadních vod.

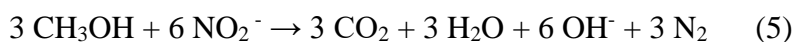
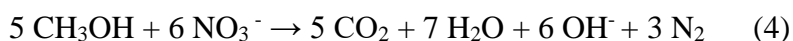
1. 3. 2. 1. 2. Denitrifikace

Denitrifikace je redukce dusitanů a dusičnanů na elementární dusík, případně oxidy dusíku (především N_2O), kdy poměr mezi vznikajícím dusíkem a oxidy dusíku závisí zejména na hodnotě pH. Probíhá v anoxických podmínkách. Provádí ji např. bakterie rodů

Pseudomonas (zvláště *Pseudomonas denitrificans*), *Micrococcus*, *Denitrobacillus* a *Chromobacterium* (Chudoba a kol. 1991; Ricklefs & Miller 1999).

Tyto organismy jsou organotrofní, pro denitrifikaci je tedy nutný organický substrát jako zdroj živin. Jedná se obvykle o organické látky obsažené v odpadní vodě nebo kalu. Pokud není splněna mezní hodnota poměru $CHSK_{Cr}/N = 2,5$, je nutné přidávat externí, snadno rozložitelný organický substrát (např. methanol), který je donorem elektronů, což zvyšuje náklady na čištění odpadní vody a může vést i k nadměrnému růstu biomasy a nutnosti jejího dalšího zpracování. Konečným akceptorem elektronů je dusičnanový nebo dusitanový dusík (Pitter 2009; Al Hazmi et al. 2022).

Pro methanol je možno denitrifikaci dusičnanů a dusitanů popsat následujícími rovnicemi (Chudoba a kol. 1991):



V procesu denitrifikace se uvolňují ionty OH^- , což může v případě nízké ZNK (zásadová neutralizační kapacita, tj. množství jednosytné silné zásady potřebné k dosažení určité hodnoty pH sledované vody) zpracovávané vody vést k výraznému nárůstu pH s následnou možnou inhibicí procesu (Chudoba a kol. 1991).

1. 3. 2. 2 Netradiční biologické postupy

Odstraňování dusíku z odpadních vod tradičním způsobem pomocí nitrifikace a denitrifikace je oblíbené pro svou vysokou účinnost, relativní jednoduchost a ve srovnání s fyzikálně-chemickými postupy menšími provozními náklady. I tento postup však má svoje nevýhody. Během nitrifikační fáze je nutno čištěnou vodu provzdušňovat a během denitrifikace je zase nutné dodávání organické hmoty, což ekonomiku celého procesu zhoršuje (van Kessel et al. 2018; Ren et al. 2020; Zhang et al. 2022; Guo et al. 2023). V tomto směru jsou problémem především odpadní vody s nízkým koncentračním poměrem $CHSK/N$ jako je např. kalová voda – viz kapitola 1. 5. Nízké koncentrace $CHSK$ jsou při vysokých koncentracích N-amon příznivé pro průběh nitrifikace, neumožňují ovšem účinnou denitrifikaci z důvodu nedostatku organického substrátu. Vysoké

koncentrace N-amon navíc mohou vést k nekontrolovatelné akumulaci dusitanů, jejichž následné převedení na dusičnany může být poté problematické (Ren et al. 2020; Zhang et al. 2022).

V současné době je proto trendem vyvíjení a zdokonalování nejrůznějších netradičních biologických postupů s cílem optimalizovat odstraňování dusíkatých sloučenin z odpadních vod. Mezi tyto nové postupy patří např. proces nitritace/denitritace nebo deamonifikace a zjednodušeně lze říci, že předpokladem pro jejich úspěšné využití je zásadní dosažení a dlouhodobé udržení cíleně vyvolané akumulace dusitanů při nitrifikaci.

Vzhledem k tomu, že netradiční biologické metody jsou méně energeticky náročné a dochází při nich k úspoře organického substrátu a rovněž objem vzniklého kalu je menší (viz následující kapitoly), je jejich zavádění do praxe v souladu s požadavky Směrnice Rady Evropské unie 91/271/EHS o čištění městských odpadních vod v aktuálním znění. V současnosti je snaha ve zvýšené míře využít při čištění odpadních vod anaerobních procesů, při nichž směsná kultura mikroorganismů postupně rozkládá biologicky rozložitelnou organickou hmotu bez přístupu vzduchu. Jejich hlavní výhodou je produkce bioplynu, jehož následná přeměna na energii a teplo přispívá k energetické soběstačnosti ČOV a snížení uhlíkové stopy (Silva et al. 2024). Nedochází při nich ovšem k odstranění N-amon. Pro tento účel se proto jako velmi perspektivní jeví zejména využití procesu ANAMMOX (viz dále), protože se při něm přeměňuje NH_4^+ a NO_2^- na N_2 bez spotřeby organického uhlíku (Gao et al. 2023).

1. 3. 2. 2. 1 Nitritace/denitritace

Princip metody nitritace/denitritace spočívá v řízení oxidace N-amon tak, aby jejím produktem byly dusitany a aby nedocházelo k jejich další oxidaci na dusičnany. Při zastavení nitrifikace ve fázi dusitanů hovoříme o tzv. zkrácené nitrifikaci. Poté následuje redukce dusitanového dusíku na dusík elementární, případně deamonifikace (viz níže).

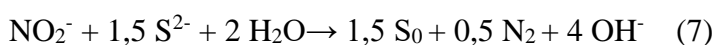
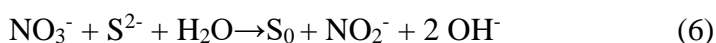
Při ideálně provozovaném procesu nitritace/denitritace lze v průběhu nitritace ušpóřit až 25 % kyslíku ve srovnání s nitrifikací a až 40 % organického substrátu při denitritaci oproti denitrifikaci (Abeling and Seyfried 1992). Proces je rovněž až 2x rychlejší (Zhu et al. 2008), vzniká při něm méně oxidu uhličitého za předpokladu, že

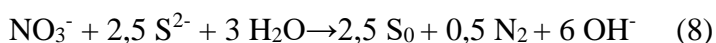
dochází k cílenému dodávání organického substrátu, a objem narostlé biomasy je menší až o 30 % (Turk & Mavinic 1989; Zhu et al. 2008).

Hromadění dusitanů nezbytné k realizaci metody nitritace/denitritace může být cíleně vyvoláno různými zásahy do nitrifikačního systému vedoucími k potlačení funkce NOB při zachování funkce AOB. AOB a NOB mají odlišné nároky na optimální podmínky prostředí a NOB jsou obecně na tyto podmínky citlivější a jejich rychlost růstu je za určitých podmínek nižší (Hellings et al. 1998). Cílem je získat biomasu, v níž budou AOB převládat nad NOB, respektive biomasu, v níž bude aktivita AOB výrazně převyšovat aktivitu NOB. To je technologicky poměrně náročný proces, který závisí na řadě parametrů. Vzhledem k tomu, že právě jeho zkoumání je předmětem této práce, faktorům, které vedou k zachování aktivity AOB a současnému potlačení aktivity NOB, je věnována samostatná kapitola 1. 4.

Na principu nitritace/denitritace je založen proces SHARON (Single reactor system for High activity Ammonium Removal Over Nitrite). Reaktor zde funguje jako chemostat, kdy doba zdržení aktivovaného kalu je shodná s hydraulickou dobou zdržení vstupní odpadní vody. Systém pracuje při teplotách 30 – 40 °C a při pH v rozmezí 7 – 8, přičemž tyto podmínky zvýhodňují AOB, proto dochází k akumulaci dusitanů v reaktoru. Dusitany jsou následně redukovány na plynný dusík. Tento proces může být využit k čištění odpadních vod s vysokou koncentrací N-amon, např. kalové vody nebo skládkových výluhů (Hellings et al., 1998; Volcke et al., 2006). Pro odpadní vody s nízkým poměrem C/N a obsahem sulfidů se jako perspektivní jeví kombinace procesů SHARON & DSR (denitrifying sulfide removal) (Guo et al. 2022).

Proces DSR spočívá ve spojení heterotrofní denitrifikace (viz kapitola 1. 3. 2. 1. 2.) s autotrofní denitrifikací, která využívá redukované sloučeniny síry (např. sulfidy nebo thiosíranu) jako donory elektronů k redukci dusičnanů nebo dusitanů na plynný dusík bez přídavku organického uhlíku a je popsána následujícími rovnicemi (Guo et al. 2020):

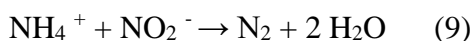




Za určitých podmínek může dojít k oxidaci S_0 na SO_4^{2-} s využitím NO_3^- jako akceptorem elektronů, což může nežádoucím způsobem zvyšovat salinitu vodních útvarů (Zhan et al. 2024). Dalším problémem je také to, že ačkoli autotrofní a heterotrofní denitrifikační bakterie spolupracují při odstraňování sulfidů, organického uhlíku a dusíku z odpadní vody, především kvůli poměrně významnému rozdílu v rychlosti jejich růstu je obtížné dlouhodobě udržovat stabilitu celého procesu (Show et al. 2013). Jako nadějně se proto jeví využití fakultativní autotrofní bakterie *Pseudomonas* sp. C27, která dokáže růst mixotrofně a využít při denitrifikaci jako donory elektronů sulfidy i organické látky (Chen et al., 2013; Guo et al. 2022). Spojení DSR s procesem produkujícím dusitan jako je např. SHARON vede k zefektivnění odstraňování dusíkatého znečištění z odpadních vod. Guo et al. (2022) uvádí účinnost odstranění celkového dusíku při použití kombinace těchto procesů vyšší než 93,5 % pro odpadní vody s poměrem C/N v rozmezí 0,646–0,737.

1. 3. 2. 2. 2 Deamonifikace

Deamonifikace je biochemická oxidačně – redukční reakce mezi amonným a dusitanovým iontem, při níž vzniká elementární dusík. Tato reakce je zjednodušeně popsána následující rovnicí:



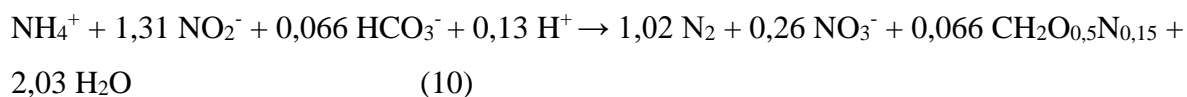
Proces je zajištěn činností některých druhů bakterií patřících do kmene *Planctomycetes*, jedná se zejména o bakterie rodů: *Candidatus Brocadia*, *Candidatus Kuenenia*, *Candidatus Jettenia*, *Candidatus scalindua*, *Candidatus Anammoxoglobus* a *Candidatus Anammoximicrobium* (Ma et al. 2015a, 2015b). Patří mezi chemolitotrofní organismy, které se obejdou bez zdroje organického substrátu.

Velkou nevýhodou jsou ale specifické vlastnosti a požadavky těchto bakterií. Vyznačují se především extrémně nízkou rychlostí růstu při nízkých teplotách a při vysokém obsahu organických látek ve vodě (Cao et al. 2017). Při čištění odpadních vod je ovšem nutné zajistit dostatečnou retenci biomasy, proto je často využíván granulovaný kal, případně jsou bakterie zachycovány na nejrůznějších nosičích ve formě biofilmu apod.

(Kosgey et al. 2021) – viz kapitola 1. 4. 6. Specifické jsou také požadavky deamonifikačních bakterií na koncentraci rozpuštěného kyslíku. Gao et al. (2014) uvádí, že jejich aktivita byla inhibována, když byla koncentrace rozpuštěného kyslíku vyšší než 0,5 mg/l.

Při činnosti bakterií nedochází k tvorbě oxidu dusného (Ma et al. 2016; Rahimi et al. 2020). Nicméně k produkci určitého množství N₂O v reaktorech využívajících deamonifikaci přesto dochází, což je dáno zejména autotrofní a heterotrofní denitrifikací, jež v reaktorech v menší míře probíhají. V systémech kombinujících deamonifikaci (nebo též ANAMMOX – viz dále) s aktivitou AOB je produkce N₂O způsobena také činností AOB, přičemž obecně platí, že emise oxidu dusného z jednostupňových systémů jsou nižší než z dvoustupňových systémů. Produkci N₂O lze snížit vhodným řízením tohoto procesu, např. zachováním poměru CHSK/N < 1, udržováním koncentrace rozpuštěného kyslíku pod 0,5 mg/l a teploty nad 30 °C (Connan et al. 2018; Wan et al. 2019).

V technologii čištění odpadních vod se aplikace výše uvedeného postupu označuje jako proces ANAMMOX (ANaerobic AMMonium OXidation) (Jetten et al. 1999), který je popsán následující rovnicí:



V současné době existuje již řada aplikací tohoto procesu v praxi a většina studií týkajících se uplatnění ANAMMOX procesu se zaměřuje na kombinaci částečné nitrifkace a ANAMMOX procesu, což se v anglicky psané literatuře označuje jako PN/A (partial nitrification/ANAMMOX). Během tohoto procesu dochází nejprve k částečné oxidaci NH₄⁺ na dusitany prostřednictvím AOB, poté se NH₄⁺ a dusitany přeměňují na plynný dusík prostřednictvím činnosti ANAMMOX bakterií.

Zásadním předpokladem aplikace tohoto schématu je dosažení stabilní nitrifkace a udržení vhodného poměru dusitanového dusíku k amoniakálnímu dusíku (NO₂⁻-N/NH₄⁺-N) mezi 1,0 a 1,3 (Jiang et al. 2022). Proces probíhá buď v jednom reaktoru nebo ve dvou samostatných reaktorech (Wang et al. 2016; Chen et al. 2021).

Kvůli nízkým nákladům a jednoduché obsluze je výhodnější varianta, kdy proces probíhá v jednom reaktoru (Isanta et al. 2015; Kouba et al. 2017).

Kombinace procesů SHARON – ANAMMOX je variantou v případě, že celý proces probíhá ve dvou reaktorech. Odpadní voda projde v prvním reaktoru částečnou nitrifikací systémem SHARON, při níž vzniknou dusitany a je upraven poměr N-amon:N-NO₂ - na cca 1:1, což je ideální pro následný ANAMMOX (van Dongen et al. 2001). Příkladem aplikací, kdy nitritace a ANAMMOX probíhá v jednom reaktoru, jsou např. systémy CANON (Completely Autotrophic Nitrogen – removal Over Nitrite) a OLAND (Oxygen – Limited Autotrophic Nitrification – Denitrification) (Kuai et al. 1998; Dijkman & Strous 1999; van Dongen et al. 2001; Henze et al. 2008). Při aplikaci procesu CANON se udržuje vhodná tloušťka biofilmu, v němž jsou deamonifikační bakterie „schovány“ před nepříznivými podmínkami (viz kapitola 1. 4. 6.), a koncentrace rozpuštěného kyslíku v čištěné vodě se pohybuje kolem 0,5 mg/l (van Haandel & van der Lubbe 2007; Ali & Okabe 2015). Proces OLAND využívá činnosti *Nitrosomonas eutropha* při limitované koncentraci rozpuštěného kyslíku (Pynaert et al. 2004). Ve srovnání se systémem CANON je odolnější vůči inhibičním vlivům koncentrací FA (Free Ammonia – volný amoniak) a FNA (Free Nitrous Acid – volná kyselina dusitá), nicméně účinnost odstraňování dusíku je poměrně nízká (kolem 40 %) a klíčové je udržování vhodné koncentrace rozpuštěného kyslíku (van Haandel & van der Lubbe 2007).

Ve srovnání s klasickým postupem nitrifikace/denitrifikace je při ideálně provozovaném procesu PN/A až o 60 % nižší spotřeba energie na aeraci, dochází k úspoře organického substrátu a snížení produkce přebytečného kalu, rovněž produkce skleníkových plynů je výrazně menší (Cao et al. 2017). Proces je ovšem komplikován specifickými požadavky ANAMMOX bakterií a jeho úspěšnost je závislá na udržení optimálního koncentračního poměru N-amon/N-NO₂⁻ v čištěné vodě. Další nevýhodou je, že ANAMMOX bakterie nejsou ve významném množství zastoupeny v běžných směsných kulturách používaných k biologickému čištění odpadních vod. Praktické využití procesu je komplikováno rovněž specifickými složkami odpadních vod jako jsou těžké kovy nebo např. sulfidy či alkoholy, které výkonnost celého systému snižují (Baun et al. 2004; Guven et al. 2005). Problémem je také omezená účinnost odstraňování dusíku v důsledku tvorby

dusičnanů, které při reakci ANAMMOX vznikají - viz rovnice č. 10 (Chen et al. 2009; Du et al. 2017).

Metody založené na deamonifikaci se přesto jeví jako velmi perspektivní, jsou předmětem rozsáhlého výzkumu a existuje jich velké množství. V poslední době je věnována pozornost např. simultánnímu procesu nitritace, ANAMMOX procesu a denitrifikace (SNAD), přičemž zařazení denitrifikace by mělo vést k vyšší celkové účinnosti odstraňování dusíku z odpadních vod při současném zachování všech výhod systému PN/A (Chen et al. 2009; Singh et al. 2022). Li et al. (2019) provedli srovnávací studii procesů SNAD a CANON při čištění splaškových odpadních vod s využitím oxidačního příkopu a uvedli, že odtoková koncentrace celkového dusíku v systému SNAD byla o 40–50 % nižší než v procesu CANON. Úspěšnost procesu SNAD je ale opět silně závislá na různých provozních parametrech jako je např. koncentrace rozpuštěného kyslíku, typu organického substrátu, typu reaktoru, poměru C/N, které je potřeba zvolit tak, aby byla zachována ekonomická a environmentální výhoda tohoto systému.

1. 4 Faktory využitelné k potlačení funkce NOB při současném zachování funkce AOB

Dosáhnout potlačení funkce NOB při současném zachování funkce AOB je poměrně náročný proces, který závisí na řadě fyzikálně-chemických a technologických parametrů. Je založen na rozdílných nárocích AOB a NOB a jejich citlivosti vůči různým faktorům jak je např. teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku, stáří kalu a složení odpadních vod, které spolu úzce souvisí a působí současně. Nejvýznamnější z těchto faktorů budou probrány v následujících kapitolách.

1. 4. 1 Koncentrace rozpuštěného kyslíku

Pro dosažení úplné nitrifikace v odpadní vodě se doporučuje udržovat koncentraci rozpuštěného kyslíku v čištěné vodě na 2 mg/l (Chudoba et al. 1991), nicméně v mnoha případech stačí koncentraci udržovat na hladině okolo 1,5 mg/l (Bae et al. 2002).

Snížením koncentrace rozpuštěného kyslíku v čištěné vodě lze dosáhnout akumulace dusitanů, což je dáno tím, že NOB mají nižší afinitu vůči rozpuštěnému kyslíku

než AOB, rozpuštěný kyslík je přednostně spotřebováván na oxidaci N-amon, a to při nedostatku kyslíku znevýhodňuje NOB, zejména ve spojení s vyšším objemovým zatížením systému dusíkem (Blackburne et al. 2008; Okabe et al. 2011; Pacek 2014). Saturační konstanta koncentrace rozpuštěného O_2 podle Monodova modelu pro AOB je 0,3 mg/l a pro NOB 1,1 mg/l, pro zachování činnosti AOB při současném potlačení činnosti NOB je tedy vhodné zvolit koncentraci, která leží mezi těmito hodnotami (Aslan et al. 2009). Van Tendeloo et al. (2022) uvádějí, že při koncentraci rozpuštěného kyslíku nižší než 0,51 mg/l dochází v biofilmovém reaktoru k dlouhodobému potlačení NOB. Nízká koncentrace rozpuštěného kyslíku je výhodná z ekonomického hlediska, v čištěné vodě však může vést k nejrůznějším problémům jako je lokální nedostatek kyslíku způsobující výpadky v účinnosti, bytnění kalu (Blackburne et al. 2007) a vyšší produkce oxidu dusného (Kampschreur et al. 2009). Ve vodách s nízkou koncentrací N-amon je nízká koncentrace rozpuštěného kyslíku hlavní strategií, jak dosáhnout zkrácené nitrifikace (Yao et al. 2021). Ve vodách s vysokou koncentrací N-amon je ale možné využít i další faktory inhibující růst a činnost NOB, proto je v nich akumulace dusitanů pozorována i při hodnotách nad 1,2 mg/l (Ciudad et al. 2005; Wang et al. 2014b; Zhao et al. 2022). Li et al. (2017) použili membránový reaktor, který zpracovával skládkový výluh, a dosáhli akumulace dusitanů při teplotě 30 ± 1 °C, hodnotě pH 7,8–8,2 a koncentraci rozpuštěného kyslíku mezi 0,5 a 1 mg/l. Poté zvyšovali objemové zatížení reaktoru dusíkem a zkrácenou nitrificaci pozorovali i při koncentraci rozpuštěného kyslíku mezi 2 a 3 mg/l, což bylo dáno vlivem dalších inhibičních faktorů jako je koncentrace FA a FNA a doby zdržení kalu.

Slibnou variantou, jak docílit zkrácené nitrifikace i ve vodách s nízkou koncentrací N-amon je střídání aerobních a anoxických podmínek, kdy vzniklá přechodná anoxie vede k omezení činnosti NOB (Kornaros et al. 2010; Regmi et al. 2016). Další variantou je regulace času, po který dochází při čištění odpadní vody k provzdušňování. Na základě měření oxidačně - redukčního potenciálu, koncentrace rozpuštěného kyslíku a hodnoty pH je provzdušňování vypnuto před nebo v době dokončení oxidace N-amon, takže další oxidace není možná v důsledku nedostatku kyslíku. Tato strategie by měla pomoci snižovat populaci NOB v čištěné vodě (Yang et al. 2007).

1. 4. 2 Teplota

Velmi důležitým faktorem, který ovlivňuje nitrifikaci, je teplota. V první řadě je důležitá pro aktivitu mikroorganismů. Nitrifikační bakterie jsou poměrně teplotně citlivé. Udává se, že pro čisté kultury je optimální hodnota pro průběh nitrifikace v rozmezí 28 – 32 °C. Při poklesu teploty o 10 °C se její rychlost snižuje přibližně na polovinu (Chudoba et al. 1991; Reino & Carrera 2021) a při teplotách pod 5 °C je již její rychlost velmi malá (Pitter 2009). Teploty pod 5 °C a přes 40 °C nitrifikaci defacto zastavují (Chudoba et al. 1991; Hellinga et al. 1998).

AOB a NOB mají odlišné teplotní nároky, obecně lze říci, že vyšší teploty zvýhodňují AOB oproti NOB, což podporuje akumulaci dusitanů (Kim et al. 2008). Rodriguez-Sanchez et al. (2014) uvádí, že při teplotě nad 24 °C je rychlost růstu NOB nižší než AOB, ale při teplotě nižší než 15 °C rostou rychleji NOB a stávají se dominantními v mikrobiální kultuře. Pro dosažení zkrácené nitrifikace je však nutné kombinovat vyšší teplotu s limitací stáří kalu (viz kapitola 1. 4. 3).

Teplota rovněž ovlivňuje koncentrace FA a FNA v čištěné vodě (Gabarro et al. 2014). Různé koncentrace FA a FNA mají různé účinky na AOB a NOB - viz kapitola 1. 4. 5, obecně se udává, že akumulace dusitanů může být při vyšších teplotách podpořena zvýšenou koncentrací FA inhibující NOB (Anthonisen et al. 1976).

Při čištění odpadních vod je provozní teplota obvykle nižší než 25 °C, což je pro průběh nitritace nevýhodné. Případné vyhřívání reaktoru je neekonomické, jsou proto hledány cesty, jak dosáhnout selektivní inhibice NOB i při nízkých teplotách, což je ale poměrně obtížné, obzvláště u odpadních vod s vysokou koncentrací N-amon (Rodríguez et al. 2011). Jednou z variant, jak zvýšit odolnost AOB vůči teplotním změnám, je imobilizace kalu v určitém nosiči, např. v polyuretanu (Chen et al. 2016) – viz kapitola 1. 4. 6.

1. 4. 3 Stáří kalu

Regulace stáří aktivovaného kalu může změnit strukturu mikrobiálního společenstva v čištěné odpadní vodě, protože doba zdvojnásobení počtu AOB je za pro ně

výhodných podmínek (zejména při vhodné teplotě – viz kapitola 1. 4. 2) o 7 – 8 hodin kratší než u NOB (Soliman & Eldyasti 2018). Při době zdržení kalu menší než dva dny je např. při vhodné teplotě možné NOB vyplavit ze systému, lze tedy říci, že krátká doba zdržení kalu akumulaci dusitanů podporuje (Hellingsa et al. 1998; Yamamoto et al. 2008). Když je doba zdržení kalu delší, k potlačení NOB je vždy potřeba využít také ostatní faktory ovlivňující nitrifikaci jako např. koncentraci rozpuštěného kyslíku, a pokud se kal ze systému neodstraňuje, zkrácené nitrifikace je těžké dosáhnout (Reino et al. 2021). Např. Pambrun et al. (2008) dosáhli zkrácené nitrifikace i při době zdržení kalu 18 dnů, jednalo se však o systém SBR, na celý proces tedy měly podstatný vliv ostatní faktory, především výkyvy pH a s nimi související koncentrace FA a FNA (viz kapitola 1. 4. 5).

Nicméně Li et al. (2017) uvádí, že dosáhnout zkrácené nitrifikace pouze pomocí udržování ideální doby zdržení kalu pro AOB není možné, vždy je potřeba využít také vliv ostatních faktorů, především teploty nebo koncentrace rozpuštěného kyslíku.

1. 4. 4 Hodnota pH

AOB a NOB mají odlišné nároky na pH prostředí, např. pro rod *Nitrosomonas* se jeví jako optimální hodnota pH v rozmezí 7,9 – 8,2 a pro rod *Nitrobacter* v rozmezí 7,2 – 7,6 (Alleman 1985). V současné době se uvádí, že pro dosažení zkrácené nitrifikace je optimální hodnota pH blízka 8,0 (Li et al. 2017).

Faktorem, který má vliv na nitrifikaci, však zřejmě často není přímo hodnota pH, ale spíše fakt, že ovlivňuje např. koncentrace FA a FNA v čištěné vodě (Pitter 2009).

1. 4. 5 Koncentrace FA a FNA

S hodnotou pH a dalšími faktory, především teplotou, souvisí koncentrace jednotlivých forem výskytu anorganického dusíku. NOB jsou citlivé především na vysoké koncentrace FA a FNA. Obecně lze říci, že s nárůstem hodnoty pH roste koncentrace FA, zatímco s poklesem hodnoty pH její koncentrace klesá a naopak se zvyšuje koncentrace FNA. Inhibičního vlivu FA a FNA se dá úspěšně využívat k potlačení aktivity NOB, které jsou vůči FA a FNA méně odolné než AOB. Z hlediska snazšího využití inhibičních vlivů FA a FNA jsou pro dosažení zkrácené nitrifikace často využívány SBR systémy

(Sequencing Batch Reactor). Čištění odpadní vody v těchto zařízeních probíhá v jedné nádrži, v níž se periodicky opakují fáze plnění reaktoru, čištění, sedimentace a odčerpávání vyčištěné odpadní vody (Blackburne et al. 2008; Gabarro et al. 2012). Pokud má čištěná odpadní voda vysokou koncentraci N-amon, může v reaktoru docházet k výrazným výkyvům v hodnotě pH, kdy nejvyšší pH je po nadávkování čištěné vody a v průběhu nitrifikace postupně klesá. Během cyklu SBR se díky tomu mohou koncentrace FA a FNA výrazně měnit. FA ovlivňuje nitrifikační bakterie zejména na začátku čistícího procesu, přičemž postupně klesá její koncentrace. Současně ale narůstá koncentrace FNA, jejíž vliv může být významný především na konci cyklu (Anthonisen et al. 1976; Gabarro et al. 2012).

Anthonisen et al. (1976) uvádí, že inhibice NOB při zachování aktivity AOB začíná při koncentraci FA v rozmezí 0,1 – 1 mg/l a koncentraci FNA v rozmezí 0,22 – 2,8 mg/l, inhibice AOB začíná při koncentraci FA v rozmezí 10 – 150 mg/l. Zhou et al. (2011) udávají, že koncentrace FNA v rozmezí 0,42–1,72 mg/l snižuje aktivitu AOB o 50 %, v rozmezí 0,011–0,07 mg/l snižuje aktivitu NOB a v rozmezí 0,026–0,22 mg/l může NOB zcela inhibovat. Zároveň ale řada autorů uvádí, že ve svých studiích dosáhli inhibice NOB mimo uvedená rozmezí.

Např. Vadivelu et al. (2006) zaznamenali úplnou inhibici NOB až při koncentraci 6 mg/l FA. Li et al. (2017) zaznamenali aktivitu NOB i při koncentraci FA 42, 4 mg/l a zároveň zjistili, že aktivita NOB nebyla plně inhibována, i když koncentrace FNA dosáhla 0,1036 mg/l. Tato skutečnost je patrně dána adaptací NOB na vysoké koncentrace FA a FNA, kterým byly po dlouhou dobu vystaveny. Vysoké koncentrace FA nebo FNA tak mohou na krátkou dobu úspěšně potlačit aktivitu NOB, nicméně existuje riziko, že se na vysoké koncentrace po určitém čase aklimatizují (An et al. 2021). Pro dlouhodobé udržení zkrácené nitrifikace je proto obvykle potřeba využít souhry více faktorů, které ji ovlivňují. Zároveň je nutné brát v úvahu, že některé rody NOB (např. rod *Nitrospira*) nejsou na účinek FNA tolik citlivé a nemusí tak k jejich úplné inhibici stačit (Ma et al. 2017; Duan et al. 2019). Inhibiční účinek FNA může být navíc oslaben také u biofilmových reaktorů (van Tendeloo et al. 2021) – viz kapitola 1. 4. 6.

Poměrně nedávno bylo také zjištěno, že FNA je podstatně biocidnější pro NOB než pro AOB za anoxických podmínek. Z tohoto důvodu je výhodné na čistírnách odpadních vod část kalu podrobit inhibičnímu vlivu FNA za anoxických podmínek odděleně od hlavní čistírenské linky a poté takto upravený kal recirkulovat do hlavního proudu na ČOV (Wang et al. 2014a).

1. 4. 6 Způsob kultivace biomasy

Potlačení činnosti NOB při současném zachování funkce AOB může být ovlivněno také způsobem kultivace biomasy zodpovědné za průběh čistícího procesu. Rozeznáváme biomasu vyskytující se ve formě suspenze (vločkový kal), granulovaný kal, biomasu zachycenou na povrchu vhodného nosiče (biofilm) a enkapsulovanou biomasu, kdy jsou mikroorganismy uzavřené do vhodného nosiče (Kouba et al. 2019; Kumwimba et al. 2020). Kal ve formě suspenze je neekonomičtější variantou a je často využíván v SBR systémech (Ren et al. 2021; Statiris et al. 2022) – viz kapitola 1. 4. 5.

Obecně lze říci, že růst mikroorganismů je více podpořen v biofilmu nebo v enkapsulované biomase, při těchto způsobech kultivace mají totiž mikroorganismy stanoviště, které je „chrání“ před nepříznivými vlivy okolního prostředí – např. před výkyvy pH nebo toxickými látkami (Zhu et al. 2012; Wang et al. 2022). Obě tyto varianty (enkapsulovaná biomasa, biofilm) tak umožňují efektivnější zadržování biomasy v reaktoru, jsou ale nákladnější, protože jsou obvykle spjaty s využitím nějakého nosiče, často plastového. To může představovat i určité environmentální riziko, protože pokud je nosič poškozen nebo je celý nedopatřením vypuštěn s vyčištěnou odpadní vodou, do životního prostředí se mohou uvolnit nežádoucí látky (Wang et al. 2022). Existuje také riziko vyplavení mikroorganismů před vznikem žádoucího biofilmu, pokud je průtok čištěné vody příliš velký, nebo naopak vzniku tzv. mrtvých zón, tedy vrstev skládajících se pouze z mrtvých buněk (Gu et al. 2020; Wang et al. 2022).

Li et al. (2011) navíc uvádí, že imobilizace mikroorganismů zmírňuje např. inhibiční účinek FA na NOB, což znamená, že ve srovnání s kalem ve formě suspenze jsou při použití imobilizované biomasy k dosažení zkrácené nitrifikace zapotřebí silnější inhibiční opatření.

K podobným závěrům dospěli v případě enkapsulované biomasy také Kouba et al. (2019). Porovnávali náběh a stabilitu částečné nitrifikace v reaktorech provozovaných v režimu SBR při 15 ° C ve vodách s koncentrací N-amon 75 – 600 mg/l s kalem ve formě suspenze, s biomasou enkapsulovanou v PVA a s biofilmem. Zjistili, že náběh částečné nitrifikace byl dvakrát rychlejší v reaktoru s biofilmem a enkapsulovanou biomasou než v reaktoru se suspendovaným kalem. Nicméně po zapracování systémů byla částečná nitrifikace v biofilmu a v suspendovaném kalu stabilní při koncentraci N-amon 150 – 600 mg/l, zatímco v systému s enkapsulovanou biomasou se rozvinula plná nitrifikace i při koncentraci N-amon 600 mg/l. Z toho vyplývá, že NOB jsou schopné se při tomto způsobu kultivace biomasy přizpůsobit i koncentracím FA 4,3 mg/l a FNA 0,27 mg/l. Pro dosažení a udržení stabilní částečné nitrifikace pro odpadní vody s koncentrací N-amon v rozmezí 150 – 600 mg/l čištěné v systému SBR se podle této studie jeví jako nejvhodnější varianta využití biofilmu.

Biofilm se zdá být výhodnou variantou v různých PN/A reaktorech zejména kvůli pomalu rostoucím ANAMMOX bakteriím a jejich citlivosti na podmínky prostředí, v němž žijí (Han et al. 2020; Kumwimba et al. 2020). Lze v něm snadněji vytvořit mikroprostředí s vhodnou koncentrací rozpuštěného kyslíku, které je nezbytné pro symbiózu ANAMMOX bakterií s AOB a zároveň eliminaci NOB (Chen et al. 2019). Biofilm obvykle obsahuje aerobní a anoxické zóny, které zprostředkovávají úzké interakce mezi různými organismy transformujícími dusík. Nitrifikační bakterie obývají převážně aerobní zónu, zatímco heterotrofní denitrifikační bakterie s ANAMMOX bakteriemi mají tendenci osidlovat anoxickou zónu (Jin et al. 2012). V praxi se nejčastěji setkáme s použitím použití membránového reaktoru (MBR - Membrane Bio Reactor), biofilmového reaktoru s pohyblivým ložem (MBBR - moving bed biofilm reactor) nebo membránovým provzdušňovaným biofilmovým reaktorem (MABR - membrane aerated biofilm reactor) (Phanwilai et al. 2020; Zhang et al. 2024).

1. 4. 7 Další faktory

Sulfidy mohou rovněž významně ovlivnit proces zkrácené nitrifikace. Vznikají redukcí síranů za anaerobních podmínek např. v kanalizaci, při anaerobním předčištění odpadních vod a hojná je na ně také kalová voda vzniklá odvodněním anaerobně

stabilizovaného kalu (viz kapitola 1. 5), případně skládkové výluhy nebo fugát z bioplynových stanic. V závislosti na složení a diverzitě populace NOB může sulfid sloužit jako selektivní inhibitor NOB (Vela et al. 2018). Řízené dávkování sulfidů do odpadní vody může vést k selektivnímu potlačení činnosti NOB, což je navíc podpořeno inhibičním účinkem FA, jehož koncentrace se zvyšuje v důsledku zvýšení pH při hydrolýze sulfidů (Erguder et al. 2008). Owaes et al. (2023) dosáhli zkrácené nitrifikace v reaktoru provozovaném v režimu SBR při dávce sulfidů 15 mg/l v odpadních vodách s koncentrací N-amon v rozmezí 50 – 70 mg/l. Kouba et al. (2017) ovšem dospěli k závěru, že sulfidy mohou selektivně inhibovat NOB a mohou tak pomoci vyvolat akumulaci dusitanů, po zapracování systému je však lepší se dávkování sulfidů vyhnout, protože mohou inhibovat kromě NOB také AOB. Je také nutné brát v úvahu složení mikrobiálního společenstva, např. rod *Nitrobacter* je vůči inhibici sulfidy odolnější než *Nitrospira* (Vela et al. 2018).

V posledních letech je snaha řídit proces zkrácené nitrifikace tak, aby „konečný produkt“ byl co nejvhodnější pro následnou ANAMMOX reakci. Využívá se účinků světla, přičemž se uvádí, že NOB jsou vůči světlu citlivější než AOB, což je patrně dáno menší odolností buněčných membrán NOB ve srovnání s AOB (Akizuki et al. 2020; Wang et al. 2021). Dále je využíván nízkofrekvenční ultrazvuk, který při určitých frekvencích a intenzitách podporuje činnost AOB (Tian et al. 2021). Pro potlačení funkce NOB při současném zachování funkce AOB je také možné využít stacionární magnetické pole, které inhibuje NOB (Jia et al. 2018). Využití světla, ultrazvuku a magnetického pole je ovšem silně ovlivněno kvalitou a množstvím vody, např. hustota a morfologie kalu může účinky světla ovlivnit velmi zásadně (Wang et al. 2021). Tyto metody jsou navíc energeticky náročné.

Vliv může mít také koncentrace kovových iontů (např. Cu^{2+}), které se při vysokých koncentracích chemicky slučují s některými enzymy, ovlivňují strukturu a aktivitu těchto enzymů a následně inhibují mikrobiální aktivitu. Podpora nebo inhibice činnosti je závislá na expoziční dávce, přičemž NOB jsou vůči působení kovových iontů citlivější než AOB (Hu et al. 2003; Su et al. 2020). Činnost AOB i NOB ovlivňuje rovněž salinita vody, AOB jsou při vysoké salinitě (25 g NaCl/l) inhibovány (García – Ruiz et al. 2018). Ovlivňování funkce AOB a NOB kovovými ionty, případně úpravou salinity vody je ovšem obvykle

spjato s vyššími provozními náklady a přidávání chemikálií do čištěné vody je problematickou otázkou i z environmentálního hlediska.

NOB mohou být selektivně inhibovány také dalšími látkami. Jednou z nich je např. hydroxylamin, který je meziproduktem nitritace. Např. Xu et al. (2012) uvádí, že pozorovali stabilní nitritaci ve vodě o koncentraci N-amon 100 mg/l při teplotě 25 °C a koncentraci hydroxylaminu 10 mg/l. Mezi další látky, které mohou být využity k akumulaci dusitanů, patří také hydrazin (Xiang et al. 2019), některá antibiotika (Albaiges et al. 1986), případně kyselina mravenčí, která inhibuje transkripci genu $nxr\beta$, což vede k inhibici oxidace dusitanů (Wang et al. 2020). I využití těchto látek má však jistá omezení nebo nevýhody. Např. antibiotika mohou negativně ovlivnit jiné organismy a jejich nedokonalé odstranění z vody je nežádoucí.

1.5 Kalová voda a její zpracování

V praxi rozeznáváme odpadní vody s vysokou (koncentrace N-amon v řádek stovek až tisíců mg/l) a nízkou koncentrací N-amon (koncentrace N-amon v řádu desítek mg/l). Mezi odpadní vody s vysokou koncentrací N-amon patří např. kalová voda vznikající na ČOV při zahušťování a odvodňování anaerobně stabilizovaného kalu, která byla využita při výzkumu v rámci této práce. V následujícím textu budou proto podrobněji rozebrána některá její specifika a způsoby jejího čištění.

Kalová voda je kapalná fáze kalových suspenzí a ČOV produkují dva základní typy této vody – kalovou vodu vzniklou při zahušťování směsného surového kalu (primární a sekundární kal může být zahušťován také zvlášť, pak je ovšem složení kalové vody vzniklé zahuštěním primárního kalu jiné než složení kalové vody oddělené při zahušťování sekundárního kalu) a kalovou vodu vzniklou při zahušťování a mechanickém odvodňování anaerobně stabilizovaného kalu. Kalová voda vzniklá při zahušťování surového kalu má podobné složení jako voda odcházející z primárního čištění či sekundárního čištění, vrací se proto do hlavní čistírenské linky a nemá významný vliv na průběh čistírenských procesů (Chudoba et al. 1991; Dohányos et al. 1998).

Pro kalovou vodu vzniklou při zahušťování a mechanickém odvodňování anaerobně stabilizovaného kalu jsou charakteristické vysoké koncentrace N-amon (0,5 g/l

– 1,5 g/l i více), vysoké koncentrace sloučenin fosforu a nízký koncentrační poměr CHSK/N, který je menší než 1, vzhledem ke koncentraci dusíku tedy obsahuje relativně nízkou koncentraci organických látek. Příčinou nízkého koncentračního poměru CHSK/N je rozklad organických látek obsahujících organický dusík během anaerobního procesu a převedení tohoto dusíku na amoniakální formu, která zůstává v kalové vodě, zatímco organický uhlík je převeden na plynné produkty, jež přecházejí do bioplynu. Při odvodnění kalu může rovněž dojít ke snížení teploty, přesto se kalová voda řadí mezi spíše teplé odpadní vody s teplotou mezi 30 a 37 °C. Její další klíčové parametry jako např. pH, neutralizační kapacity nebo koncentrace živin jsou ovlivněny složením odpadních vod a provozními parametry při anaerobním zpracování kalu. Kvalita dané kalové vody je tak do určité míry specifická pro danou lokalitu, což je potřeba vzít v úvahu při výběru správné technologie odstraňování dusíku (Chudoba et al. 1991; Fux & Siegrist 2004; Gustavsson et al. 2010).

Kalová voda vzniklá při zahušťování a mechanickém odvodňování anaerobně stabilizovaného kalu je rovněž vracena do hlavní linky čištění před primární nebo sekundární stupeň, vzhledem k jejímu složení se však mohou objevovat komplikace při odstraňování sloučenin dusíku a fosforu v aktivačním systému. Její dávkování proto musí být řízené (Chudoba et al. 1991; Dohányos et al. 1998).

Účinným řešením je oddělené čištění této kalové vody (tzv. sidestream), které snižuje celkové zatížení dusíkem v hlavním proudu čistírny (tzv. mainstream) a přispívá tak k optimalizaci čistícího procesu. Kalová voda je zpracována odděleně od hlavní čistírenské linky a teprve poté je vypouštěna zpět do aktivačního systému či před mechanické čištění, přičemž hlavní důraz je kladen především na co nejúčinnější odstranění N-amon. Jedná se o ekonomicky výhodnější variantu, protože úpravy hlavní linky ČOV jsou obvykle nákladnější. Kalová voda je pro své vlastnosti (vyšší teplota, vyšší koncentrace N-amon a nízký poměr CHSK:N) vhodná k aplikaci netradičních biologických metod, především díky nižším provozním nákladům ve srovnání s tradičním procesem nitrifikace/denitrifikace (Lackner et al. 2014; Karmann et al. 2024).

Dosažení zkrácené nitrifikace, která je obvykle základem aplikace těchto netradičních biologických metod, je obecně snazší v odpadních vodách s vysokou

koncentrací N-amon, než ve vodách s nízkou koncentrací N-amon. Lze v nich totiž např. lépe využít inhibice NOB toxickými formami dusíku. Potlačení funkce NOB při současném zachování funkce AOB je však dáno obvykle souhrou více faktorů, kromě inhibice toxickými formami dusíku je využívána např. vysoká teplota nebo snížená koncentrace rozpuštěného kyslíku (Kim et al. 2008; Rogriguez - Sanchez et. al. 2014; Li et al. 2017).

Při odděleném čištění kalové vody je stále častěji využíván proces PN/A, který už byl v praxi aplikován ve více než 150 objektech ČOV (Lackner et al. 2014; Karmann et al. 2024). Ekonomicky nejvýhodnější jsou jednostupňové systémy, kde procesy PN/A probíhají ve stejné jednotce (Yang et al. 2018), z hlediska řízení celého procesu jde ale o složitější variantu. AOB potřebují kyslík, zatímco ANAMOX bakterie vyžadují anoxické prostředí, problémem je také vymývání kalu ve formě suspenze. Řešením se zdá být vhodná kultivace biomasy – tvorba biofilmu na vhodném nosiči, biomasa ve formě granulí nebo kombinace těchto strategií (Huang et al. 2016; Chen et al. 2024) – viz kapitola 1. 4. 6.

Na tomto místě je vhodné poznamenat, že poslední době je snaha využít metodu PN/A také v mainstreamu, tedy při čištění městských odpadních vod, v nichž se koncentrace N-amon pohybuje obvykle v řádu desítek mg/l. Nízké koncentrace amoniakálního dusíku a nízké teploty splaškových odpadních vod však zatím její aplikaci omezují (Wu et al. 2021; Wang et al. 2022). Pro zvýšení úspěšnosti procesu je výhodné čištěnou vodu inokulovat kalem z již zapracovaného systému PN/A, pomalu rostoucí ANAMMOX bakterie kultivovat v biofilmu (Yang et al. 2018; Yang et al. 2019) a pro potlačení růstu NOB regulovat koncentraci rozpuštěného kyslíku např. střídáním oxických a anoxických fází nebo regulací délky časových úseků s aerací (Pedrouso et al. 2018; Gustavsson et al. 2020) – viz kapitola 1. 4. 1. V této oblasti se také jeví jako perspektivní využití comammox procesu (viz kapitola 1. 3. 2. 1. 1) ve spojení s ANAMMOX procesem, i zde je ale účinnost odstranění dusíkatého znečištění komplikována nízkými teplotami čištěné vody (Shao & Wu 2021). Li et al. (2023) proto navrhuje zvýšit odolnost comammox a ANAMMOX bakterií vůči nízkým teplotám např. jejich imobilizací do hydrogelových kapslí.

1. 6 Shrnutí

Jak vyplývá z předcházejícího textu, v posledních několika letech došlo k výraznému pokroku v oblasti odstraňování dusíkatého znečištění z odpadních vod pomocí netradičních biologických metod, stále ovšem existuje řada aspektů, které je potřeba optimalizovat, přičemž snahou je docílit co nejstabilnějšího a nejúčinnějšího čistícího procesu za co nejvýhodnějších ekonomických podmínek. Je třeba si uvědomit, že základem většiny netradičních biologických metod je úspěšné dosažení a dlouhodobé udržení zkrácené nitrifikace. K pokroku v této oblasti se snažil přispět i výzkum představený v rámci této práce.

2 Cíle a hypotéza

Hypotéza

Základní hypotézou práce je předpoklad, že změny fyzikálních a technologických parametrů při nitrifikaci probíhající v biologickém stupni čištění odpadních vod povedou k významným změnám v zastoupení jednotlivých skupin nitrifikačních organismů ve směsné kultuře odpovědné za proces čištění, přičemž v určitých případech bude dosaženo stavu, kdy organismy zajišťující biochemickou oxidaci N-amon na N-NO_2^- budou vykazovat aktivitu, zatímco aktivita organismů druhého stupně nitrifikace nebude z technologického hlediska významná. V důsledku toho bude nitrifikační proces ukončen ve fázi dusitanů.

Cíle práce

Cílem disertační práce je vyhodnotit vliv různých fyzikálně-chemických a technologických parametrů (teplota a její kolísání, vstupní koncentrace N-amon v čištěné vodě, hodnota pH, objemové zatížení amoniakálním dusíkem) na výskyt konečných produktů nitrifikace a s tím související aktivitu AOB a NOB. Práce si klade za cíl rozšířit současné znalosti v oblasti netradičních postupů odstraňování N-amon z odpadních vod a na základě výsledků provedených experimentů tyto procesy optimalizovat.

3 Publikované práce

3.1 Publikovaná práce č. 1

- 1) Radechovský J, Švehla P, Hrnčířová H, Pacek L, Balík J. 2013. Inhibiční působení sloučenin dusíku při nitrifikaci odpadních vod. Chemické Listy **107**:892 – 896.

INHIBIČNÍ PŮSOBENÍ SLOUČENIN DUSÍKU PŘI NITRIFIKACI ODPADNÍCH VOD

JOSEF RADECHOVSKÝ, PAVEL ŠVEHLA,
HELENA HRNČÍŘOVÁ, LUKÁŠ PACEK
a JIŘÍ BALÍK

*Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin,
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů,
Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129,
165 21 Praha 6 – Suchbátka
radechovsky@af.czu.cz*

Došlo 25.4.13, přijato 27.9.13.

**Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby
urychleného publikování.**

Klíčová slova: nitrifikace, odpadní voda, N-amon, volný
amoniak, volná kyselina dusitá, nitritace

Úvod

Nitrifikace je v kombinaci s denitrifikací podstatou biologického odstraňování sloučenin dusíku z odpadních vod^{1,2}. Probíhá ve dvou základních stupních, za které jsou zodpovědné dvě samostatné skupiny nitrifikačních bakterií. Do procesu vstupuje amoniakální dusík (N-amon), který je nejprve oxidován na dusitanový dusík (N-NO₂⁻) a ten následně na dusík dusičnanový (N-NO₃⁻). Oxidaci N-amon na dusík dusitanový (nitritace) způsobují bakterie rodu *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* a další nitritační bakterie označované jako AOB (Ammonium Oxidizing Bacteria). Druhou část biologické oxidace vzniklých dusitanů na dusičnany zajišťují bakterie rodu *Nitrospira*, *Nitrobacter* a další nitratační bakterie souhrnně označované jako NOB (Nitrite Oxidizing Bacteria).

Aktivita nitrifikačních organismů je do značné míry závislá na teplotě^{3,4}, aktuální koncentraci rozpuštěného kyslíku^{5,6} a technologických parametrech čistícího procesu⁷. Činnost nitrifikačních organismů významně ovlivňuje i koncentrace sloučenin dusíku účastnících se nitrifikačního procesu. Zejména jsou z tohoto pohledu diskutovány jednotlivé disociační formy N-amon a N-NO₂⁻. V tomto případě hovoříme o tzv. substrátové či produktové inhibici činnosti nitrifikačních organismů⁸. Většinou se uvádí, že inhibiční nitrifikace způsobují zejména nedisociované formy výskytu N-amon a N-NO₂⁻, tedy nedisociovaný amoniak (FA – Free Ammonia) a kyselina dusitá (FNA – Free Nitrous Acid)⁹. Výsledky některých studií naznačují i možnost inhibičního působení disociovaného iontu na některé skupiny nitrifikačních organismů⁸. Zastoupení zmíněných disociačních forem je závislé zejména na hod-

notě pH a teplotě^{9,10}. Citlivost jednotlivých druhů a rodů nitrifikačních organismů vůči zmíněným dusíkatým sloučeninám je pochopitelně různá. Obecně platí, že AOB jsou vůči těmto vlivům podstatně rezistentnější než NOB. Proto může při nitrifikaci za určitých okolností docházet k hromadění produktu činnosti AOB, tedy dusitanů. Jejich zvýšená koncentrace pak může sekundárně vyřazení NOB z činnosti ještě více podpořit. Popsaný jev je v přirozených ekosystémech naprosto nežádoucí vzhledem k toxicitě dusitanů vůči vodním organismům¹⁰ a za běžných okolností se mu ze stejného důvodu snažíme zabránit i při biologickém čištění odpadních vod. Na druhou stranu je však možno cílenou selektivní inhibicí činnosti NOB využít při aplikaci některých inovativních biologických postupů odstraňování N-amon^{2,11,12}.

Cílem experimentů, jejichž výsledky jsou prezentovány v rámci tohoto příspěvku, bylo získat formou dlouhodobých laboratorních testů nové poznatky o citlivosti jednotlivých skupin nitrifikačních organismů na přítomnost FA a FNA při procesu biologického čištění odpadní vody s variabilním obsahem N-amon.

Experimentální část

Pokusy probíhaly v laboratorním měřítku jako simulace biologického čištění odpadní vody s variabilním obsahem N-amon. Jako vstupní voda byla použita kalová voda vznikající při odvodňování anaerobně stabilizovaného kalu na ústřední čistírně odpadních vod v Praze. Tato voda obsahovala N-amon v koncentračním rozmezí 1000–1400 mg l⁻¹ a byla vodovodní vodou ředěna na požadovanou koncentraci N-amon.

Experiment probíhal v laboratorním modelu biologického reaktoru, který byl vytvořen z plexiskla. Celý model byl umístěn v termostatické skříni nastavené na teplotu 15 °C. Pracovní objem čištěné vody byl 1,5 dm³ a jeho provzdušňování hrubobublinnou aerací bylo zajištěno akvaristickým motorkem. Koncentrace rozpuštěného kyslíku v reaktoru nebyla limitována a po celou dobu experimentu přesahovala 5 mg l⁻¹. Čerpání vstupující a vystupující vody probíhalo pomocí peristaltických čerpadel. Reaktor byl na počátku pokusu inokulován směsí kalové vody a tzv. vratného aktivovaného kalu¹ odebraného v biologickém stupni čištění na pražské ústřední čistírně odpadních vod v objemovém poměru 1:1,5. Koncentrace nerozpuštěných organických látek (NL_{org}) v použitém aktivovaném kalu činila 6,96 g l⁻¹. V průběhu celého provozu modelu se koncentrace NL_{org} v reaktoru pohybovala mezi 0,25–0,90 g l⁻¹. Reaktor pracoval v režimu semikontinuálního průtoku čištěné odpadní vody na principu SBR (Sequencing Batch Reactor)¹ v následujících pracovních cyklech: přítok odpadní vody – 10 minut; aerace – 5 hodin 20 minut během etap 5–8 a 11 hodin 20 minut během etap 1–4 a 9–11; sedimentace – 20 minut; odtok vyčištěné odpadní vody – 10 minut. Objemové zatížení amoniakálním dusíkem bylo po celou dobu experimentů udržováno na stabilní hodnotě okolo 0,2 kg m⁻³ d⁻¹. Zatížení kalu (kg N-amon přivedené

Tabulka I
Harmonogram provozu laboratorního modelu

Etapa	Dny provozu	N-amon vstup [mg l^{-1}]	Počet cyklů za den	Doba zdržení [h]
1	0–64	600	2	55,8
2	65–222	600	2	60,4
3	223–322	300	2	36,0
4	323–384	150	2	18,0
5	385–443	75	4	9,8
6	444–475	75	4	9,2
7	476–511	75	4	9,0
8	512–525	150	4	17,3
9	526–533	300	2	34,0
10	534–551	600	2	68,0
11	552–570	1000	2	128,5

na $1 \text{ kg NL}_{\text{org}}$ za jeden den) oscilovalo v závislosti na aktuální koncentraci NL_{org} v reaktoru mezi hodnotami $0,22$ a $0,80 \text{ kg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Hodnota pH nebyla regulována, což omezovalo účinnost odstranění N-amon na hodnotách okolo 50% (cit.¹³).

Provoz laboratorního modelu trval celkově 570 dnů a byl rozdělen do jednotlivých etap, ve kterých se v přibližném rozsahu $75\text{--}1000 \text{ mg l}^{-1}$ měnila koncentrace N-amon ve vstupní vodě. V závislosti na změnách nitrifikační aktivity byla vybrána období s konstantní vstupní koncentrací N-amon rozdělena do více etap. Důležité parametry laboratorního modelu v jednotlivých etapách jeho provozu jsou uvedeny v tab. I.

Jednou týdně bylo s využitím spektrofotometru HACH DR/4000 prováděno spektrofotometrické měření koncentrací jednotlivých forem dusíku (N-amon, N-NO_2^- , N-NO_3^-) ve vstupní vodě a na odtoku z reaktoru. Zároveň byla sledována teplota, hodnota pH a koncentrace kyslíku v reaktoru pomocí přenosných sond WTW pH-electrode Sen Tix 21 a WTW Cell Ox 325. Hodnota pH byla též sledována a zaznamenávána kontinuálně pomocí sondy Gryf PCL 321 XB2 napojené na měřicí software Gryf Magic XBC. Dále byl jednou týdně gravimetricky stanovován obsah NL_{org} . Průběh jednotlivých etap experimentu byl hodnocen také kinetickými testy, při kterých byly koncentrace jednotlivých forem dusíku a další důležité parametry proměřovány v pravidelných intervalech vždy během jedné aerační fáze. Stanovení hodnot jednotlivých sledovaných parametrů bylo realizováno dle práce¹⁴.

Koncentrace volného amoniaku (FA) a volné kyseliny dusité (FNA) byly na základě literárních údajů⁹ vypočteny podle rovnic:

$$C_{\text{FA}} (\text{mg l}^{-1} \text{NH}_3) = \frac{17}{14} \frac{C_{\text{N-amon}} \cdot 10^{\text{pH}}}{\left[\exp(6334 / (273 + ^\circ\text{C})) + 10^{\text{pH}} \right]} \quad (1)$$

$$C_{\text{FNA}} (\text{mg l}^{-1} \text{HNO}_2) = \frac{47}{14} \frac{C_{\text{N-amon}}}{\left[\exp(-2300 / (273 + ^\circ\text{C})) + 10^{\text{pH}} \right] + 1} \quad (2)$$

V rámci etapy 2 byl 126. den provozu reaktoru odebrán vzorek biomasy aktivovaného kalu z laboratorního modelu, ve kterém bylo na specializovaném pracovišti metodou FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) stanoveno zastoupení AOB a NOB.

Výsledky a diskuse

Podmínky panující v reaktoru a koncentrace jednotlivých forem dusíku na odtoku

Během zapracování systému při vstupní koncentraci N-amon 600 mg l^{-1} (etapa 1) nepřesahovala souhrnná koncentrace oxidovaných forem (N-NO_2^- a N-NO_3^-) na odtoku z reaktoru až do 58. dne pokusu 80 mg l^{-1} . Koncentrace N-amon v odtoku činila v tomto období průměrně 330 mg l^{-1} . Pokles vůči koncentraci N-amon ve vstupní vodě byl vyvolán stripováním amoniaku podpořeným vysokou hodnotou pH v reaktoru¹⁰. Ta se pohybovala v rozmezí $8,4$ a $9,2$ a v průběhu jednotlivých cyklů se příliš neměnila.

Na přelomu etapy 1 a 2 došlo mezi 58. a 65. dnem k nárůstu koncentrace N-NO_2^- na 234 mg l^{-1} . Zároveň se v tomto období také začala odlišovat hodnota pH na začátku cyklu (maximální hodnota v průběhu cyklu, průměrně $7,9$) a na konci cyklu SBR (minimální hodnota, v průměru $6,7$). Tyto výkyvy v hodnotě pH byly charakteristické po celé další období provozu reaktoru. Pokles hodnoty pH vedl ke snížení maximálních dosahovaných koncentrací FA v reaktoru, ale zároveň společně s rostoucí koncentrací N-NO_2^- způsobil významný nárůst maximálních dosahovaných koncentrací FNA.

Tabulka II

Průměrné hodnoty maximální koncentrace FA a FNA dosahované během pracovního cyklu a průměrné odtokové koncentrace N-amon, N-NO₂⁻ a N-NO₃⁻ v jednotlivých etapách

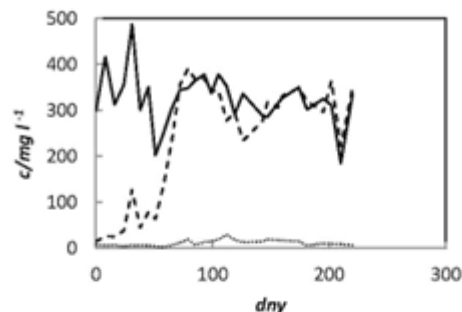
Etapa	FA – max	FNA – max	Koncentrace [mg l ⁻¹]		
			N-amon	N-NO ₂ ⁻	N-NO ₃ ⁻
1	61,42	0,001	330,5	62	6
2	13,26	0,923	323,0	322	14
3	5,54	0,754	164,2	180	5
4	3,99	0,391	74,2	87	4
5	1,54	0,056	36,0	34	8
6	1,35	0,046	36,1	21	20
7	0,84	0,001	30,4	3	37
8	1,04	0,061	62,3	1	73
9	5,96	0,000	176,7	0	132
10	7,30	0,067	311,5	1	340
11	9,11	0,097	502,2	1	366

V dalším průběhu experimentu (etapy 2–5) byl poměr koncentrací N-amon a N-NO₂⁻ na odtoku z reaktoru relativně vyrovnaný (cca 1:1,05) a konkrétní hodnoty koncentrace těchto forem dusíku závisely na vstupní koncentraci N-amon. Koncentrace N-NO₃⁻ nepřevyšovala 20 mg l⁻¹.

K zásadní změně v zastoupení jednotlivých forem dusíku došlo v průběhu etapy 6. V tomto období postupně narůstalo zastoupení N-NO₃⁻ mezi formami dusíku na výstupu z reaktoru a současně klesalo zastoupení N-NO₂⁻. V následující etapě 7 pak mezi oxidovanými formami dusíku N-NO₃⁻ jasně dominoval nad N-NO₂⁻. Stejně tomu bylo až do konce experimentu. Průměrné hodnoty maximální koncentrace FA a FNA dosahované v průběhu cyklu při jednotlivých etapách provozu reaktoru jsou uvedeny v tab. II. Zároveň tato tabulka přináší průměrné koncentrace základních forem dusíku v odtoku z reaktoru.

Zhodnocení aktivity AOB v podmínkách experimentu

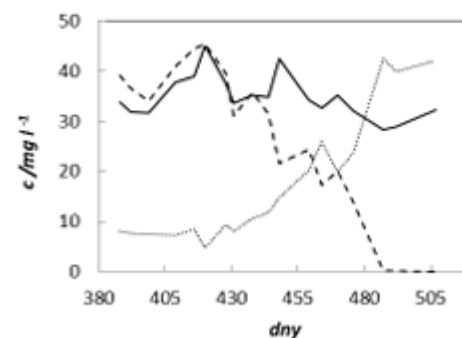
Po zahájení provozu systému při vstupní koncentraci N-amon 600 mg l⁻¹ nebyla patrna výraznější aktivita AOB. Tuto skutečnost je v daných podmínkách možno připsat překročení inhibičního limitu FA pro AOB⁹. Jejich činnost doprovázená nárůstem koncentrace N-NO₂⁻ v odtoku z reaktoru (viz obr. 1) a poklesem hodnoty pH (cit.¹) během pracovního cyklu reaktoru byla zaznamenána na přelomu etap 1 a 2. Nárůst aktivity AOB v této fázi byl patrně důsledkem adaptace biomasy na extrémní podmínky panující v systému¹⁵. Intenzivní činnost AOB byla zachována po celé zbývající období experimentu.



Obr. 1. Hodnoty koncentrací jednotlivých forem dusíku *c* na odtoku z reaktoru mezi dny 0–222 (etapy 1 a 2); — N-amon [mg l⁻¹], ---- N-NO₂⁻ [mg l⁻¹], N-NO₃⁻ [mg l⁻¹]

Zhodnocení aktivity NOB v podmínkách experimentu

Aktivita NOB byla v důsledku podmínek panujících v reaktoru potlačena během prvních pěti etap provozu reaktoru. Práce⁹ zmiňuje v souvislosti s inhibiční aktivitu NOB koncentrací FA v rozmezí 0,1–1 mg l⁻¹. Pro FNA je z hlediska inhibice NOB dle stejných autorů zlomová koncentrace v rozmezí 0,2–2,8 mg l⁻¹. Maximální koncentrace FA a FNA dosahované během pracovního cyklu laboratorního reaktoru se v etapách 2–5 postupně snižovaly, nicméně pro FA se nedostávaly pod výše uvedené rozmezí (viz tab. II). Maximální dosahované koncentrace FNA pod zmiňovanou inhibiční mez poklesly v etapě 5 (tab. II). Pozvolný nárůst koncentrace dusičnanů na úkor dusitanů během etapy 6 svědčí o zvýšení aktivity NOB v této fázi provozu reaktoru (viz obr. 2). V etapě 7 již NOB přetvářely prakticky veškerý N-NO₂⁻ produkovaný AOB na N-NO₃⁻.



Obr. 2. Hodnoty koncentrací jednotlivých forem dusíku *c* na odtoku z reaktoru ve dnech 385–512 (etapy 5–7); — N-amon [mg l⁻¹], ---- N-NO₂⁻ [mg l⁻¹], N-NO₃⁻ [mg l⁻¹]

Přestože v posledních etapách (etapy 8–11) byla opět zvýšena vstupní koncentrace N-amon a maximální koncentrace FA dosahovaná během pracovního cyklu byla v etapách 10 a 11 podstatně vyšší než v případě etap 3–5, činnost NOB již nebyla potlačena. Toto zjištění prokazuje, že NOB jsou při dlouhodobém provozu systému po určité době schopny snášet koncentrace FA silně převyšující limity zmiňované v literatuře⁹. Na možnost adaptace NOB na vysoké koncentrace FA poukazuje i práce¹⁶. Za předpokladu schopnosti NOB adaptovat se na FA je možno konstatovat, že v etapách 2–5 byla z pohledu restrikce činnosti NOB klíčová inhibice vyvolaná FNA, popř. disociovaným N-NO_2^- (cit.^{8,9}). Nelze vyloučit ani možnost, že stěžejní bylo v této fázi provozu reaktoru vystavení biomasy současnému působení FA a FNA a kolísání jejich koncentrací vyvolané semikontinuálním průtokem čištěné vody¹⁷. Při kontinuálním průtoku byla v rámci dřívějších experimentů zaznamenána zvýšená rezistence NOB vůči současnému působení FA a FNA v koncentracích převyšujících inhibiční limity¹⁸.

Výsledky kinetických testů a mikrobiologických rozborů

Výše prezentované hodnocení aktivity jednotlivých skupin nitrifikačních organismů bylo potvrzeno i výsledky kinetických testů a mikrobiologických rozborů realizovaných v rámci jednotlivých etap provozu reaktoru.

Při kinetických testech zpravidla docházelo k relativně rovnoměrné produkci oxidovaných forem dusíku v průběhu první poloviny cyklu SBR, v řadě případů však bylo zaznamenáno určité snížení rychlosti odstraňování N-amon ve druhé polovině cyklu. Zastoupení N-NO_2^- a N-NO_3^- mezi oxidovanými formami se přitom v jednotlivých etapách pochopitelně lišilo v závislosti na aktuální aktivitě AOB a NOB (viz výše). V období, ve kterém byly konečným produktem nitrifikace výhradně

dusičnany, docházelo zpravidla v rámci cyklu k přechodnému hromadění N-NO_2^- , což indikuje vyšší rychlost odstranění N-amon činností AOB ve srovnání s rychlostí odstranění N-NO_2^- v rámci činnosti NOB. Tato situace je dokumentována i v obr. 3, který popisuje průběh cyklu 493. den provozu reaktoru v rámci etapy 7.

Mikrobiologická analýza provedená dne 126 (etapa 2) potvrdila značnou převahu AOB (*β-Proteobacteria*, halo-filní a halotolerantní *Nitrosomonas* jako malé a střední klastry, dále jako volné bakterie) nad NOB (*Nitrobacter*, *Nitrospirae* pouze v nepatrném množství)¹⁹, což je v souladu s výsledky chemických rozborů provedených v rámci této etapy.

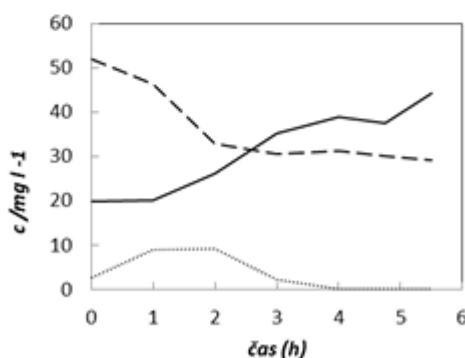
Závěr

V rámci provedených experimentů bylo potvrzeno, že disociovaný amoniak působí inhibičně na mikroorganismy obou stupňů nitrifikačního procesu, přičemž nitratační organismy jsou vůči této inhibici podstatně odolnější než organismy nitratační. Zároveň bylo prokázáno, že při dlouhodobějším vystavení nitritačních i nitratačních mikroorganismů působení nedisociovaného amoniaku může dojít k jejich adaptaci na podmínky prostředí. Dusitanový dusík se při semikontinuálním průtoku čištěné vody zároveň ukázal jako stěžejní faktor dlouhodobě inhibující činnost nitratačních organismů při čištění odpadních vod obsahujících N-amon v koncentračním rozmezí 150–600 mg l^{-1} .

Příspěvek byl vypracován v rámci řešení projektů podporovaných Celouniverzitní grantovou agenturou (CIGA) ČZU v Praze, registrační čísla projektů 20122022 a 20132012 a v rámci grantu NAZV Q191C199. Autoři děkují poskytovatelům dotace za finanční podporu výzkumu.

LITERATURA

1. Chudoba J., Dohányos M., Wanner J.: *Biologické čištění odpadních vod*. SNTL, Praha 1991.
2. Švehla P., Jeniček P., Habart J., Hanč A., Černý J.: *Chem. Listy* 101, 776 (2007).
3. van Kempen R., Mulder, J. W., Uijterlinde, C. A., Loosdrecht M. C. M.: *Water Sci. Technol.* 44, 145 (2001).
4. Fux Ch., Boehler M., Huber P., Brunner I., Siegrist H.: *J. Biotechnol.* 99, 295 (2002).
5. Ruiz G., Jeison D., Chamy R.: *Water Res.* 37, 1371 (2003).
6. Blackburne, R., Yuan, Z., Keller, J.: *Water Res.* 42, 2166 (2008).
7. Pollice A., Tandoi V., Lestingi C.: *Water Res.* 36, 2541 (2002).
8. Buday J., Drtil M., Hutňan M., Derco J.: *Chem. Papers* 53, 379 (1999).
9. Anthonisen A. C., Loehr R. C., Prakasam T. B. S.,



Obr. 3. Průběh cyklu v rámci 493. dne provozu laboratorního modelu (etapa 7); --- N-NH_3 [mg l^{-1}], — N-NO_2^- [mg l^{-1}], N-NO_3^- [mg l^{-1}]

- Srinath E. G.: *J. Water Poll. Contr. Fed.* 48, 835 (1976).
10. Pitter P.: *Hydrochemie*. Vydavatelství VŠCHT, Praha 1999.
 11. Hellinga C., Schellen A. A. J. C., Mulder J. W., van Loosdrecht M. C. M. Heijnen, J. J.: *Water Sci. Technol.* 37, 135 (1998).
 12. van Dongen U., Jetten M. S. M., van Loosdrecht M. C. M.: *Water Sci. Technol.* 44, 153 (2001).
 13. Jeníček P., Švehla P., Zábranská J.: *Water Sci. Technol.* 49, 73 (2004).
 14. Horáková M.: *Analytika vody*. Vydavatelství VŠCHT, Praha 2000.
 15. Turk O., Mavinic D. S.: *J. Water Poll. Contr. Fed.* 61, 1440 (1989).
 16. Mossakowska A., Reinius L.-G., Hultman B.: *Water Environ. Res.* 69, 1128 (1997).
 17. Park S., Bae W.: *Process Biochem.* 44, 631 (2009).
 18. Švehla P., Jeníček P., Habart J., Hanč A., Balík J.: *Chem. Listy* 104, 343 (2010).
 19. Stryjová H.: Soukromé sdělení. (2012)

J. Radechovský, P. Švehla, H. Hrnčířová, L. Páček, and J. Balík (*Department of Agro-environmental chemistry and Plant Nutrition, Czech University of Life Sciences Prague, Prague*): **The Inhibition Effect of Nitrogen Compounds during Nitrification of Wastewater**

The aim of this work was to evaluate the influence of ammonia and nitrite on the activity of nitrification bacteria during biological wastewater treatment. The experiment was performed using laboratory model of nitrifying reactor with semi-continual flow treating wastewater with variable ammonia concentration. No nitrification activity was registered during the first phase of reactor operation at ammonia input concentration 600 mg l^{-1} . The increase of the activity of ammonia oxidising bacteria was observed after 65 days of reactor operation. On the other hand, nitrite oxidising bacteria were inhibited for another 12 months, although the ammonia input concentration was gradually decreased. Gradual increase of the activity of nitrite oxidising bacteria was registered after the decrease of ammonia input concentration to 75 mg l^{-1} . Subsequent gradual increase of ammonia concentration to 1000 mg l^{-1} doesn't induce the inhibition of both groups of nitrification bacteria.

3. 2 Publikovaná práce č. 2

Svehla P, Radechovsky J, Hrcirova H, Pacek L, Bartacek J. 2015. Effect of influent nitrogen concentration on feasibility of short-cut nitrification during wastewater treatment in activated sludge systems. *Chemical Papers* **69**:921 – 929.

Effect of influent nitrogen concentration on feasibility of short-cut nitrification during wastewater treatment in activated sludge systems

^aPavel Svehla, ^aJosef Radechovsky, ^aHelena Hrcirova*, ^aLukas Pacek, ^bJan Bartacek

^aDepartment of Agro-Environmental Chemistry and Plant Nutrition, Czech University of Life Sciences in Prague, Kamýcká 129, Prague 6 165 21, Czech Republic

^bDepartment of Water Technology and Environmental Engineering, Institute of Chemical Technology Prague, Technická 5, Prague 6 166 28, Czech Republic

Received 1 October 2014; Revised 28 November 2014; Accepted 19 December 2014

The inhibitory effect of free ammonia and free nitrous acid on nitrite-oxidising bacteria (NOB) was studied in a laboratory-scale sequencing batch reactor with a suspended microbial culture. The reactor was operated at 15 °C, with a dissolved oxygen concentration in excess of 5 mg L⁻¹ and a nitrogen-loading rate of 0.2 kg m⁻³ d⁻¹. Diluted reject water with varying total ammonia nitrogen (TAN) concentrations was used as influent. N-NO₂⁻ represented more than 90 % of all of the oxidised nitrogen, with influent TAN concentrations of 600 mg L⁻¹, 300 mg L⁻¹ and 150 mg L⁻¹, respectively. With a TAN concentration of 75 mg L⁻¹, a gradual increase in N-NO₃⁻ concentration was detected, indicating the threshold value enabling short-cut nitrification (SN) to be between 150 mg L⁻¹ and 75 mg L⁻¹ under the pertaining conditions. Next, the influent concentration of TAN was gradually increased from 75 mg L⁻¹ to 1000 mg L⁻¹ but the nitrite accumulation was not restored. This indicates that once NOB are established in the suspended microbial culture, even high TAN concentrations are not sufficient for NOB inhibition.

© 2015 Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences

Keywords: activated sludge system, free ammonia, free nitrous acid, input nitrogen concentration, short-cut nitrification, nitrite-oxidising bacteria

Introduction

When used for removing nitrogen from wastewater, the short-cut nitrification (SN)/denitrification process or SN/Anammox process can contribute substantial energy savings to wastewater treatment facilities, while preserving their high efficiency (Abeling & Seyfried, 1992; van Dongen et al., 2001; van Kempen et al., 2001; Lackner et al., 2014). SN reactors work under conditions wherein ammonia-oxidising bacteria (AOB) are fully active and the activity of nitrite-oxidising bacteria (NOB) is limited by controlling the environmental and/or technological parameters.

The strategies available for SN are based on the high growth rate of AOB at elevated temperatures (35–40 °C) (Hellings et al., 1998; van Kempen et al., 2001), the high affinity of AOB for dissolved oxygen (DO) (Ruiz et al., 2003) and the high sensitivity of NOB towards toxic nitrogen species such as free ammonia (FA), free nitrous acid (FNA) and dissociated nitrite (Anthonisen et al., 1976; Buday et al., 1999; Vadivelu et al., 2006, 2007).

The application of elevated temperatures, in combination with a short sludge retention time (SRT), is confined to warm, preferably highly concentrated side wastewater streams (Fux et al., 2002; van Kempen

*Corresponding author, e-mail: hrncirovah@af.czu.cz

et al., 2001), as heating the entire wastewater stream would be prohibitively energy-demanding. This strategy was previously used with the SHARON[®] process for the treatment of reject water from mesophilic digesters (Hellings et al., 1998; van Kempen et al., 2001).

DO limitation has also been applied, primarily to the treatment of concentrated streams such as reject water or landfill leachate (Ruiz et al., 2003; Ganigué et al., 2009; Li et al., 2014; Páček et al., 2014). DO concentrations of approximately 0.7 mg L⁻¹ have been cited as being the optimal level, since the NOB activity is limited while the AOB remain active. However, the optimal DO range is very narrow and AOB activity may decrease, thereby compromising the efficiency of nitrogen removal at limited DO concentrations (Ruiz et al., 2003; Zekker et al., 2011; Páček et al., 2014). For diluted wastewater, DO-control strategies are even more complex, relying on sophisticated air-supply sequences that are typically applied in a sequencing batch reactor (SBR), and not yet proven as stable (Guo et al., 2009; Zekker et al., 2011; Bournazon et al., 2013; Ge et al., 2014).

The selective inhibition of NOB by FA and/or FNA can only function if the FA and FNA concentrations permanently or periodically exceed the inhibition limits for NOB. This can be more readily achieved in a SBR than in a continuously operated completely stirred tank reactor (CSTR), because high FA and FNA concentrations periodically occur in SBRs at the start (FA) and end (FNA) of the SBR cycle (Park & Bae, 2009; Svehla et al., 2014). Moreover, this can be achieved at a relatively low temperature without limiting the SRT or DO (Jeníček et al., 2004; Svehla et al., 2014). When combined with other selective pressures, such as a low SRT or low DO, NOB washout can be achieved even when applied to wastewater with a total ammonia nitrogen (TAN) concentration of less than 100 mg L⁻¹ (Zekker et al., 2011). The possibility of initiation of SN based on the inhibition of NOB using FA and/or FNA as the sole selection factor is limited by the influent TAN concentration (Li et al., 2013; Kouba et al., 2014; Wei et al., 2014). However, the lower limits of influent TAN concentration that still ensure FA and FNA toxicity to NOB in SBRs have not yet been thoroughly studied for a flocculent biomass (activated sludge). Kouba et al. (2014) studied the SN process in a moving bed bioreactor (MBBR), operated as an SBR, and concluded that influent TAN concentrations of below 300 mg L⁻¹ did not reliably induce NOB inhibition unless another stress factor were present. Additionally, temperature was defined as a factor influencing the concentration threshold required for the application of SN. Moreover, they found that, once the NOB population developed in the reactor, the NOB were not inhibited, even when the influent TAN concentration increased to 600 mg L⁻¹.

This study sought to identify the lower limit of in-

fluent TAN concentration that can ensure NOB inhibition through FA and/or FNA toxicity in an SBR operated at a low temperature (15 °C) with a suspended culture. In addition, the reversibility of the development of NOB inside the reactor was studied.

Experimental

Reactor set-up

The experiment was performed with biomass cultivated in the form of activated sludge in an SBR system with a working volume of 1.5 L. To simulate real conditions in wastewater treatment plant facilities, the temperature in the system was maintained at 15 °C. The whole system was located within a thermostatic box for this purpose. The operational process of an applied SBR system consists of an aeration phase (5–11 h), sedimentation phase (20 min), discharge of output water phase (10–20 min) and pumping of input water phase (10–20 min). Reject water diluted with tap water was used as input water. The nitrogen-loading rate (NLR) was kept at a constant value of 0.2 kg m⁻³ d⁻¹ throughout the operation. The DO concentration in the reactor was not limited (fluctuating between 5 mg L⁻¹ and 8 mg L⁻¹). The reactor was aerated using the coarse bubble system. Peristaltic pumps were used for dosing treated water into the reactor. The reactor was inoculated with nitrifying activated sludge. The start-up phase of the reactor operation was performed at a TAN input concentration of 600 mg L⁻¹ and lasted for 64 days (data not shown). In accordance with Svehla et al. (2014), no excess sludge was drained from the reactor, the aim being to maintain the maximum amount of AOB in the system. The value of pH was not adjusted during the treatment process. The operation of the laboratory model lasted over 506 days and was divided into five phases (P1–P5), with variable TAN concentrations in the input water. The duration of particular periods (P1–P4; at least two months) was selected to take into consideration the possibility that the NOB would adapt to the actual concentration of toxic nitrogen species (Turk & Mavinic, 1989; Zhou et al., 2011). The reactor was operated with 2 cycles per day throughout P1 and P3; during P4 and part of P5 (days 448–460), the number of cycles per day was increased to 4 as a consequence of the increased volume exchanged within the cycle. The input TAN concentration was gradually decreased from 600 mg L⁻¹ (P1) to 75 mg L⁻¹ (P4). Subsequently, it was gradually increased from 75 mg L⁻¹ to 1000 mg L⁻¹ within P5. The concentration was first adjusted to 150 mg L⁻¹ for 12 days, then to 300 mg L⁻¹ (8 days), 600 mg L⁻¹ (16 days) and 1000 mg L⁻¹ (10 days) during this period. The conditions in particular phases are summarised in Table 1.

Table 1. Operational parameters of reactor

Phase	Operation days	TAN input/(mg L ⁻¹)	Cycles per day	HRT/h
P1	1–158	600	2	72
P2	159–258	300	2	36
P3	259–320	150	2	18
P4	321–447	75	4	9
P5	448–506	150–1000	2–4	18–120

HRT – Hydraulic retention time.

Table 2. Chemical composition of reject water

Parameter	Average	Range
pH	8.1	7.8–8.4
alkalinity/(mmol L ⁻¹)	95	79–123
COD/(mg L ⁻¹)	1470	690–3170
COD soluble/(mg L ⁻¹)	1210	560–2640
TAN/(mg L ⁻¹)	1170	900–1500
P-tot/(mg L ⁻¹)	43	29–57
TSS/(g L ⁻¹)	1.45	0.55–2.95

Treated water

Reject water produced during the dewatering of sludge anaerobically digested under thermophilic conditions at a large municipal wastewater treatment plant was used as an input. TAN concentrations in the raw reject water ranged between 900 mg L⁻¹ and 1500 mg L⁻¹. The chemical composition of the reject water used is presented in Table 2. For the purpose of this study, the reject water was diluted with tap water in order to meet the required inlet concentration of TAN.

Analytical methods

Temperature, pH and DO concentration were measured on WTW instruments pH 340i and oxi 340i (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Germany) and using GRYF sensors PCl 321 XB2 and KCl 12 XB4 (GRYF HB, Czech Republic). In combination with the measuring system GRYF MAGIC XBC (GRYF HB), it was possible to continually monitor pH and the dissolved oxygen concentration. The alkalinity was determined by titration of the sample with hydrochloric acid (0.1 mg L⁻¹) up to pH 4.5. The concentrations of N-NO₂⁻, chemical oxygen demand (COD), total suspended solids (TSS) and volatile suspended solids (VSS) were determined in accordance with the standard methods (American Public Health Association, 1995). TAN, N-NO₃⁻, and P-tot concentrations were determined using a Hach (Hach Lange, Germany) DR/4000 photometer by HACH method numbers 10023, 10020 and 8190, respectively.

Calculations

The concentrations of FA (C_{FA}) and FNA (C_{FNA}) were calculated in accordance with Anthonisen et al. (1976) and Park and Bae (2009):

$$C_{FA} \text{ (mg L}^{-1} \text{ NH}_3\text{)} = \frac{17}{14} \frac{C_{TAN} \cdot 10^{pH}}{[\exp(6334/(273 + T)) + 10^{pH}]} \quad (1)$$

$$C_{FNA} \text{ (mg L}^{-1} \text{ HNO}_2\text{)} = \frac{47}{14} \frac{C_{N-NO_2^-}}{[\exp(-2300/(273 + T)) + 10^{pH}] + 1} \quad (2)$$

where C_{TAN} and $C_{N-NO_2^-}$ represent the actual total concentrations of TAN and N-NO₂⁻, respectively, and T is the temperature in degrees centigrade.

Kinetic experiments

The operation of the system within individual periods was also evaluated by kinetic experiments, during which the concentrations of particular nitrogen forms and other important parameters were measured at hourly intervals.

Fluorescence in situ hybridisation

Fluorescence in situ hybridisation (FISH) was carried out on a one-off basis in accordance with Daims et al. (2006) to quantify the amount of AOB and NOB in the sludge from the reactor. The AOB were identified using Nso190 and Nso1225 probes (Generi Biotech, Czech Republic) and the NOB were identified using Ntspa712, Ntspa662 and NIT3 probes (Generi Biotech). FISH images were collected using an Olympus BX51-RFAA epifluorescence microscope (Olympus, Japan) with a charge-coupled device (CCD) camera. Sludge was sampled at day 188 (period 2). FISH was carried out at the Department of Water Technology and Environmental Engineering, Institute of Chemical Technology Prague (Czech Republic).

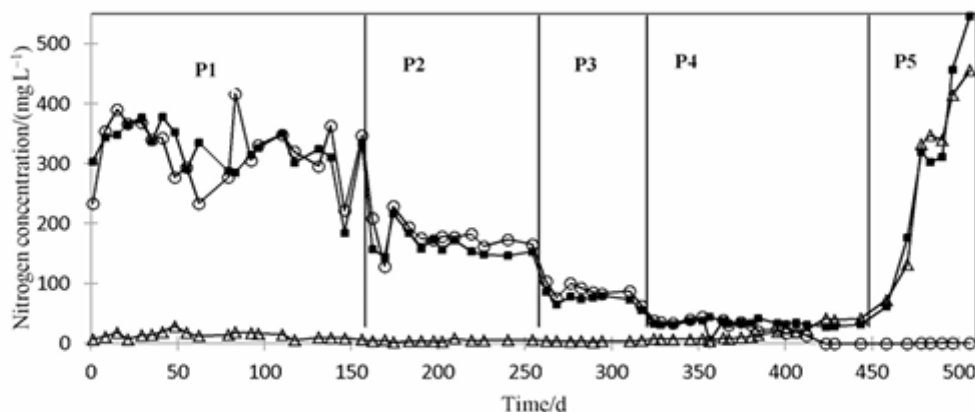


Fig. 1. TAN (■), N-NO_3^- (Δ) and N-NO_2^- (O) concentrations in effluent from reactor.

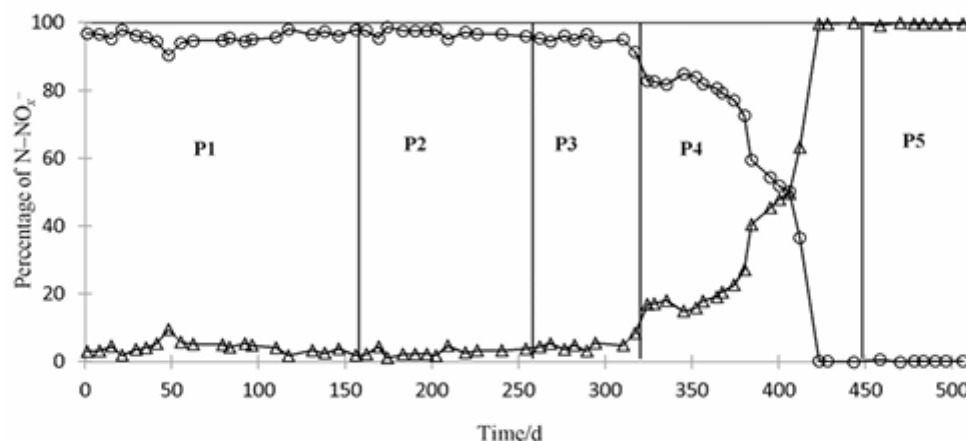


Fig. 2. N-NO_3^- (Δ) and N-NO_2^- (O) as proportion of oxidised nitrogen in effluent.

Results and discussion

Nitrogen species in effluent during gradual decrease of input TAN concentration

The concentrations of TAN, N-NO_2^- and N-NO_3^- in the effluent during different periods of reactor operation are shown in Fig. 1.

N-NO_2^- represented more than 90 % of the total oxidised nitrogen during phases P1, P2 and P3 (initial TAN concentrations of 600 mg L^{-1} , 300 mg L^{-1} and 150 mg L^{-1}). Simultaneously, a very low proportion of N-NO_3^- (not exceeding 10 %) was detected over time within these periods (Fig. 2). During period P4 (TAN input concentration of 75 mg L^{-1}), a gradual increase in N-NO_3^- concentration was detected. At the beginning of P4, the N-NO_3^- concentration increased to between 17 % and 21 % and remained relatively

stable over the first 53 days of this period. Then, N-NO_3^- increased again; after 102 days in P4, N-NO_3^- represented almost all of the oxidised nitrogen present in the reactor.

The results of P1 to P4 indicate the apparent threshold value of TAN input concentration which enables the successful application of SN to be between 150 mg L^{-1} and 75 mg L^{-1} under the given conditions. The inhibition effect of FA and FNA was sufficient to restrict NOB activity during P1 to P3. However, the decrease in input TAN concentration to 75 mg L^{-1} during P4 led to the gradual restoration of NOB activity. This finding is in accordance with Kouba et al. (2014), who derived a similar conclusion from analogous experiments (15°C ; $\text{NLR } 0.2 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$; variable input TAN concentration related to a gradual decrease in input TAN concentration from 600 mg L^{-1} to 75 mg L^{-1}) which tested the behaviour of a nitri-

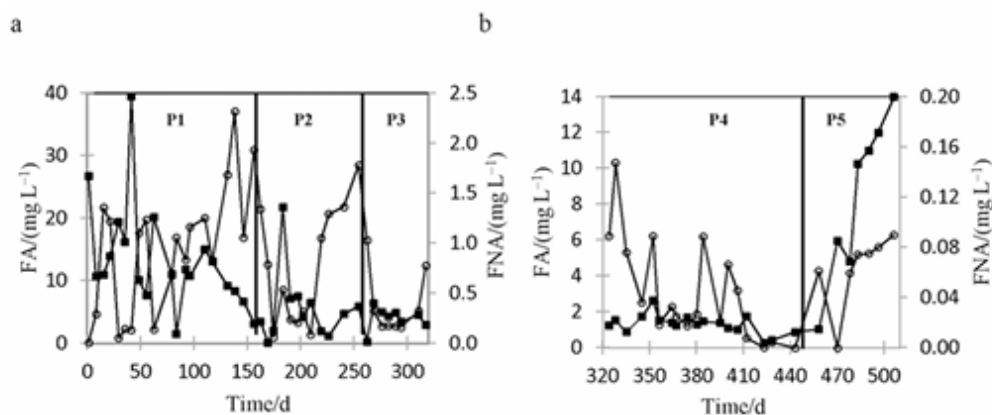


Fig. 3. Maximum FA (■) and FNA (○) concentrations in P1, P2, P3 (a); P4 and P5 (b).

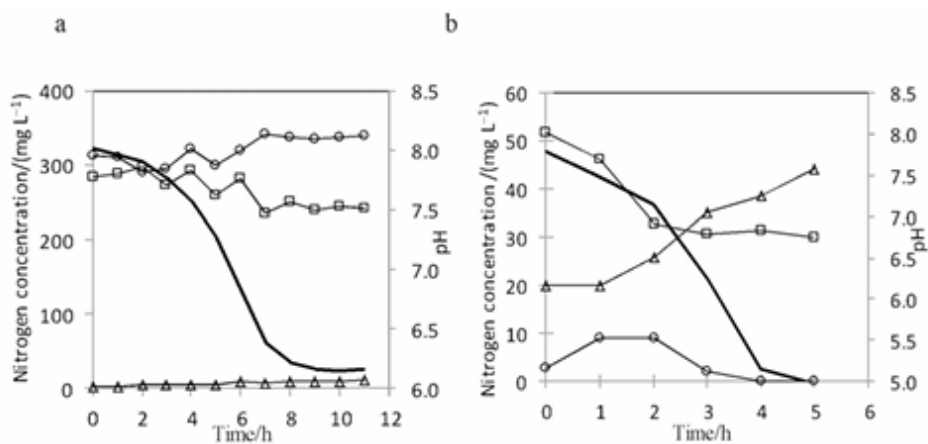


Fig. 4. Changes in pH (—) and concentration of TAN (■), N-NO₂⁻ (○) and N-NO₃⁻ (Δ) during SBR cycle within P1 (a) and P4 (b).

ifying biomass cultivated in the form of biofilm in a MBBR. The decrease in TAN input concentration to 75 mg L⁻¹ resulted in the transformation of SN into standard nitrification in the experiment described by Kouba et al. (2014). The present results indicate that the sensitivity of NOB towards FA and FNA is comparable for biomass cultivated in the forms of suspension and biofilm under the conditions applied. Accordingly, the effect of the stratification of biomass throughout the biofilm and substrate diffusion (Wang et al., 2009) does not appear to be crucial to achieving SN under the given conditions.

Inhibition pressure caused by FA, FNA and N-NO₂⁻

When the focus is directed towards evaluation of the actual FA and FNA concentrations during the ex-

periment, it is possible to conclude that the maximum FA concentration in the system achieved at the beginning of the SBR cycle (Svehla et al., 2014) exceeded the inhibition limits of 0.1 mg L⁻¹ to 1.0 mg L⁻¹ presented by Anthonisen et al. (1976) and Vadivelu et al. (2007) in connection with NOB activity over all the periods. The average value of the maximal FA concentrations gradually decreased from 13.3 mg L⁻¹ registered in P1 to 1.2 mg L⁻¹ in P4 (Fig. 3). However, the 0.2 mg L⁻¹ to 2.8 mg L⁻¹ inhibition limit of FNA to restrict NOB activity (Anthonisen et al., 1976) was not exceeded at any point during P4. Values of up to 0.15 mg L⁻¹ were registered at the beginning of this period. A gradual decrease in FNA concentration within P4 was caused by the increase in NOB activity (see above); as such, the very low inhibition limit of FNA noted by Vadivelu et al. (2006) within the context of the anabolic processes of *Nitrobacter* sp.

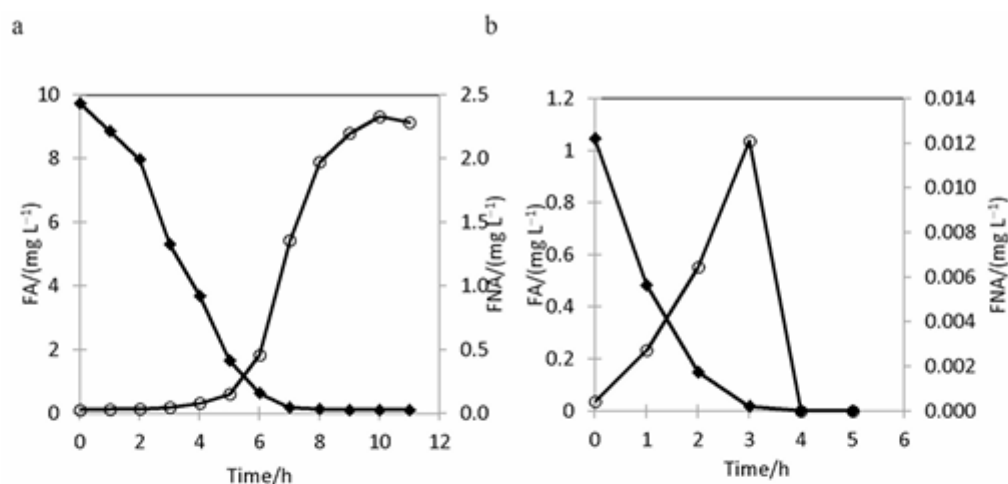


Fig. 5. Progress of FA (◆) and FNA (○) concentration during SBR cycle in P1 (a) and P4 (b).

(0.011 mg N-HNO₂ L⁻¹) was not exceeded at the end of P4. As a result, NOB activity recovered gradually during P4. The concentration of dissociated N-NO₂⁻ significantly exceeding the 198 mg L⁻¹ limit reported by Buday et al. (1999) to cause 50 % inhibition of NOB activity was measured during P1 (Fig. 1). Values approaching this limit were detected during P2.

Results of kinetic experiments

The changes in the pH and concentration of TAN, N-NO₂⁻, and N-NO₃⁻ during the SBR cycle within the periods with maximum input TAN concentration (P1, day 156) and minimum input TAN concentration (P4, day 443) are documented in Fig. 4. The kinetic test performed in P4 took place on day 443, when no N-NO₂⁻ was detected in the effluent. However, a temporary accumulation of N-NO₂⁻, achieving up to 9.2 mg L⁻¹, was observed in the first 3 h of the SBR cycle (Fig. 4b). This finding indicates the possibility of improving the N-NO₂⁻/N-NO₃⁻ ratio in the effluent by real-time aeration duration control (Guo et al., 2009), even at an input TAN concentration of 75 mg L⁻¹, as pertained during P4.

A detailed evaluation of the progress of FA and FNA concentrations found from kinetic experiments in P1 (day 156) and P4 (day 443) can be seen in Fig. 5.

Performance of reactor after repeated increase in input TAN concentration

Within the last phase of the reactor operation (P5), the concentration of TAN in the influent was gradually increased to 1000 mg L⁻¹ so as to evaluate the possibility of reverting to the N-NO₂⁻/N-NO₃⁻ ratio achieved in P1 to P3. However, the nitrite accumulation was not restored, although the FA concentra-

tion at the beginning of the aeration phase mounted to 14 mg L⁻¹ (Fig. 3b), exceeding most of the values noted during the phases with effective NOB inhibition (P1–P3; Fig. 3a). The pH at the beginning of the SBR cycle (maximum pH) measured at several instances during P1 (up to 8.5) was slightly higher than the pH at P5 (7.9 at maximum). Therefore, the maximum FA concentration observed during P1 (40 mg L⁻¹) was significantly higher than the maximum value during P5 (14 mg L⁻¹). This pertains despite the maximum influent TAN concentration in P5 (1000 mg L⁻¹) being significantly greater than in P1 (600 mg L⁻¹). Although NOB inhibition levels (Anthonisen et al., 1976; Vadivelu et al., 2007) were significantly exceeded, the NOB were fully active and N-NO₂⁻ concentration did not exceed 2 mg L⁻¹ during P5. At the same time, the FNA concentration was very low for this reason (Fig. 3b). Taking into account that an FNA concentration of up to 3.1 mg L⁻¹ did not result in long-term selective NOB inhibition in the CSTR treating reject water and, given that it was not combined with an extreme FA concentration (Svehla et al., 2014), it may be concluded that the combination of both inhibiting species (FA and FNA) is necessary for effective SN under the conditions applied. In accordance with Sun et al. (2013), the results indicate that a certain synergetic effect exists between FA and FNA in connection with NOB inhibition.

Similar findings were observed by Kouba et al. (2014) during the operation of a biofilm reactor under conditions comparable to those in the present experiment. The increase in TAN concentration from 75 mg L⁻¹ to 150 mg L⁻¹ did not result in the restoration of SN, although an effective NOB accumulation was originally observed by these authors at 150 mg L⁻¹ at 15 °C.

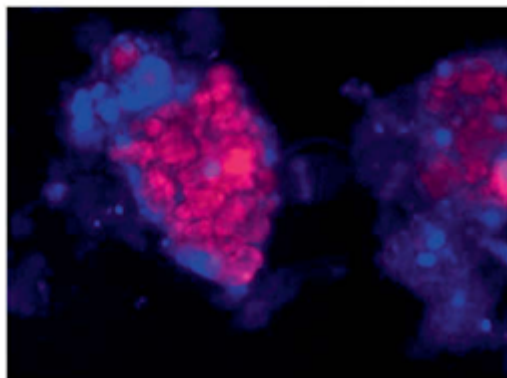


Fig. 6. FISH analysis: AOB are rose-coloured (magnification $\times 320$).

Sludge quantity and quality

Although no excess sludge was withdrawn, the concentration of VSS throughout the experiment (P1–P5) varied between 0.25 g L^{-1} and 0.90 g L^{-1} , where no strict dependence of the actual VSS concentration on the influent TAN concentration applied within particular periods was observed. The low loading rate applied to the reactor appears to be the main reason for this low concentration of activated sludge. The intense fluctuation in VSS during the experiment was probably largely caused by the variable concentrations of the organic substrate contained in the raw reject water (see the values of COD presented in Table 2) and by the consequent unstable growth of heterotrophs in the activated sludge present in the reactor. Also, the fluctuation in the concentration of inert VSS in the raw reject water may to some extent be responsible for the apparent changes in biomass concentration. With regard to the fact that no excess sludge was withdrawn on purpose, the SRT was only limited by the amount of sludge escaping with the effluent. The concentrations of TSS and VSS in the effluent did not exceed 0.25 g L^{-1} and 0.15 g L^{-1} , respectively. The lowest SRT values (5–8 days) were observed during P4 as a consequence of the most intense TSS escape at the high volumetric loading of the reactor. As a significant increase in NOB activity was observed only during P4, it might be argued that it was caused by low SRT during P4. However, the effect of low SRT should be the opposite – low SRT is thought to facilitate the wash-out of NOB (Hellinga et al., 1998; van Kempen et al., 2001).

FISH (Fig. 6) showed that AOB prevailed over NOB during P2; AOB accounted for 13.8 % of the total biomass and NOB for less than 1 %. These results explain the accumulation of nitrites in the reactor over this period.

Potential implications for operation of nitrite-producing reactors

The results presented here indicate that SN induced by the fluctuation of FA and FNA during the SBR cycle could not only be applied successfully to the treatment of reject water or other wastewater with an extremely high TAN concentration (Svehla et al., 2014) but also to wastewaters with significantly lower TAN concentrations (approximately 150 mg L^{-1}). At the same time, low temperatures attaining 15°C appear to be sufficient from the perspective of long-term NOB inhibition under the given conditions, despite the fact that the more rapid growth of NOB than that of AOB at temperatures lower than 20°C has previously been reported in the literature (Hellinga et al., 1998). On the other hand, the application of the system presented for the treatment of municipal wastewater or anaerobically pre-treated municipal wastewater (Hendrickx et al., 2012) does not appear to be realistic, by reason of the insufficient TAN concentration in this type of wastewater. The combination of the inhibition effect of FA and/or FNA with other factors limiting NOB activity (e.g. real-time aeration duration control (Guo et al., 2009)) appears to be necessary in these cases.

The actual intensity of the FA- and FNA-induced inhibition pressure on NOB is not determined solely by the input concentration of nitrogen. The pH and the neutralisation capacity of raw treated water, which strongly influences the intensity of pH fluctuation (and simultaneously FA and FNA fluctuations) during the SBR cycle, are very important parameters with regard to the practical applications of the results presented in this paper. In addition, the feeding strategy during SBR operation (the method of treated water dosage, number of cycles per day, etc.) appears to be an important factor (Svehla et al., 2014). Accordingly, a certain degree of variability exists, depending on the chemical composition of the treated water and the technological arrangement of the system. In addition, in the case of wastewater with a TAN concentration that approaches the limit found in this experiment (approximately 150 mg L^{-1}), it is necessary to consider the potential risk of NOB adaptation to FA and/or FNA (Turk & Mavinic, 1989; Zhou et al., 2011) with regard to the long-term operation of the reactor. At the same time, the results presented here prove that the restoration of SN may be highly problematic in the case of a decrease in input TAN concentration below the critical value enabling the SN. The authors plan to conduct subsequent research on these issues.

The average $\text{N-NO}_2^-/\text{TAN}$ concentration ratio attained 1.0 to 1.1 throughout P1 to P3, thus approaching the optimal value for the subsequent anammox process (van Dongen et al., 2001; Hendrickx et al., 2012). Simultaneously, TAN removal efficiency was limited to $(49 \pm 6) \%$ throughout the reactor oper-

ation owing to the insufficient alkalinity of the treated water. To improve the efficiency of SN for subsequent applications of short-cut denitrification, pH control would appear to be necessary, which is similar to the treatment of undiluted reject water (Jenicek et al., 2004).

Conclusions

The influence of influent TAN concentration on the feasibility of short-cut nitrification in an activated sludge system was clearly demonstrated in this study. The threshold value of the influent TAN concentration that enables the application of the short-cut nitrification process is between 75 mg L^{-1} and 150 mg L^{-1} under the conditions applied (SBR, 15°C , diluted reject water treatment, $\text{NLR } 0.2 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, no SRT and oxygen limitation, no pH control). This paper also shows that, once the NOB becomes abundant in the suspended culture, the increase in the influent TAN concentration up to 1000 mg L^{-1} no longer inhibits the NOB activity.

Acknowledgements. The authors gratefully acknowledge the support given by the University-wide internal grant agency of CULS Prague – CIGA, project number 20132012. The support given by European Commission grant ERG-2010-268417, 'Biofilms in Bioreactors for Advanced Nitrogen Removal from Wastewater (BioNIT)' and MSM 6046137308 is also gratefully acknowledged.

References

- Abeling, U., & Seyfried, C. F. (1992). Anaerobic-aerobic treatment of high strength ammonium wastewater - nitrogen removal via nitrite. *Water Science & Technology*, 26, 1007–1015.
- Anthonisen, A. C., Loehr, R. C., Prakasam, T. B. S., & Srinath, E. G. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 48, 835–852.
- American Public Health Association (1995). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (19th ed.). Washington, DC, USA: American Public Health Association.
- Bournazou, M. N. C., Hooshiar, K., Arellano-Garcia, H., Wozny, G., & Lyberatos, G. (2013). Model based optimization of the intermittent aeration profile for SBRs under partial nitrification. *Water Research*, 47, 3399–3410. DOI: 10.1016/j.watres.2013.03.044.
- Buday, J., Dřtil, M., Hutňan, M., & Derco, J. (1999). Substrate and product inhibition of nitrification. *Chemical Papers*, 53, 379–383.
- Dains, H., Lückler, S., & Wagner, M. (2006). *Daimo*, a novel image analysis program for microbial ecology and biofilm research. *Environmental Microbiology*, 8, 200–213. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2005.00880.x.
- Fux, C., Boehler, M., Huber, P., Brunner, I., & Siegrist, H. (2002). Biological treatment of ammonium-rich wastewater by partial nitrification and subsequent anaerobic ammonium oxidation (anammox) in a pilot plant. *Journal of Biotechnology*, 99, 295–306. DOI: 10.1016/S0168-1656(02)00220-1.
- Ganigué, R., Gabarró, J., Sánchez-Melsió, A., Rusalleda, M., López, H., Vila, X., Colprim, J., & Balaguer, M. D. (2009). Long-term operation of a partial nitrification pilot plant treating leachate with extremely high ammonium concentration prior to an anammox process. *Bioresour. Technology*, 100, 5624–5632. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.06.023.
- Ge, S. J., Peng, Y. Z., Qiu, S., Zhu, A., & Ren, N. Q. (2014). Complete nitrogen removal from municipal wastewater via partial nitrification by appropriately alternating anoxic/aerobic conditions plug-flow step feed process. *Water Research*, 55, 95–105. DOI: 10.1016/j.watres.2014.01.058.
- Guo, J. H., Peng, Y. Z., Wang, S. Y., Zheng, Y. N., Huang, H. J., & Ge, S. J. (2009). Effective and robust partial nitrification to nitrite by real-time aeration duration control in an SBR treating domestic wastewater. *Process Biochemistry*, 44, 979–985. DOI: 10.1016/j.procbio.2009.04.022.
- Hellinga, C., Schellen, A. A. J. C., Mulder, J. W., van Loosdrecht, M. C. M., & Heijnen, J. J. (1998). The sharon process: An innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water. *Water Science and Technology*, 37, 135–142. DOI: 10.1016/S0273-1223(98)00281-9.
- Hendrickx, T. L. G., Wang, Y., Kampman, C., Zeeman, G., Temmink, H., & Buisman, C. J. N. (2012). Autotrophic nitrogen removal from low strength waste water at low temperature. *Water Research*, 46, 2187–2193. DOI: 10.1016/j.watres.2012.01.037.
- Jenicek, P., Svehla, P., Zabravská, J., & Dohanyos, M. (2004). Factors affecting nitrogen removal by nitrification/denitrification. *Water Science and Technology*, 49(5–6), 73–79.
- Kouba, V., Catryse, M., Stryjova, H., Jonatova, I., Volcke, E. I. P., Svehla, P., & Bartacek, J. (2014). The impact of influent total ammonium nitrogen concentration on nitrite oxidizing bacteria inhibition in moving bed biofilm reactor. *Water Science and Technology*, 69, 1227–1233. DOI: 10.2166/wst.2013.757.
- Lackner, S., Gilbert, E. M., Vlaeminck, S. E., Joss, A., Horn, H., & van Loosdrecht, M. C. M. (2014). Full-scale partial nitrification/anammox experiences – An application survey. *Water Research*, 55, 292–303. DOI: 10.1016/j.watres.2014.02.032.
- Li, H. S., Zhou, S. Q., Huang, G. T., & Xu, B. (2013). Partial nitrification of landfill leachate with varying influent composition under intermittent aeration conditions. *Process Safety and Environmental Protection*, 91, 285–294. DOI: 10.1016/j.psep.2012.05.009.
- Li, H. S., Zhou, S. Q., Huang, G. T., & Xu, B. (2014). Achieving stable partial nitrification using endpoint pH control in an SBR treating landfill leachate. *Process Safety and Environmental Protection*, 92, 199–205. DOI: 10.1016/j.psep.2013.01.005.
- Pacek, L., Svehla, P., Bartacek, J., Radechovsky, J., Hrnčirova, H., Shejbalova, S., Balík, J., & Jenicek, P. (2014). Direct and indirect effects of oxygen limitation on nitrification process applied to reject water treatment. *Desalination and Water Treatment*. DOI: 10.1080/19443994.2014.950336. (in press)
- Park, S. J., & Bae, W. K. (2009). Modelling kinetics of ammonium oxidation and nitrite oxidation under simultaneous inhibition by free ammonia and free nitrous acid. *Process Biochemistry*, 44, 631–640. DOI: 10.1016/j.procbio.2009.02.002.
- Ruiz, G., Jeison, D., & Chamy, R. (2003). Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration. *Water Research*, 37, 1371–1377. DOI: 10.1016/S0043-1354(02)00475-X.
- Sun, H. W., Bai, Y., Peng, Y. Z., Xie, H. G., & Shi, X. N. (2013). Achieving nitrogen removal via nitrite pathway from urban landfill leachate using the synergetic inhibition of free ammonia and free nitrous acid on nitrifying bacteria activity. *Water Science and Technology*, 68, 2035–2041. DOI: 10.2166/wst.2013.342.
- Svehla, P., Bartacek, J., Pacek, L., Hrnčirova, H., Radechovsky, J., Hanc, A., & Jenicek, P. (2014). Inhibition effect of free ammonia and free nitrous acid on nitrite-oxidising bacteria

- during sludge liquor treatment: influence of feeding strategy. *Chemical Papers*, 68, 871–878. DOI: 10.2478/s11696-014-0538-6.
- Turk, O., & Mavinic, D. S. (1989). Stability of nitrite build-up in an activated sludge system. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 61, 1440–1448.
- Vadivelu, V. M., Yuan, Z. G., Fux, C., & Keller, J. (2006). The inhibitory effects of free nitrous acid on the energy generation and growth processes of an enriched *Nitrobacter* culture. *Environmental Science & Technology*, 40, 4442–4448. DOI: 10.1021/es051694k.
- Vadivelu, V. M., Keller, J., & Yuan, Z. G. (2007). Effect of free ammonia on respiration and growth process of an enriched *Nitrobacter* culture. *Water Research*, 41, 826–834. DOI: 10.1016/j.watres.2006.11.030.
- Van Dongen, U., Jetten, M. S. M., & van Loosdrecht, M. C. M. (2001). The SHARON[®]–Anammox[®] process for treatment of ammonium rich wastewater. *Water Science and Technology*, 44(1), 153–160.
- Van Kempen, R., Mulder, J. W., Uijterlinde, C. A., & van Loosdrecht, M. C. M. (2001). Overview: full scale experience of the SHARON[®] process for treatment of rejection water of digested sludge dewatering. *Water Science and Technology*, 44(1), 145–152.
- Wang, R. C., Terada, A., Lackner, S., Smets, B. F., Henze, M., Xia, S. Q., & Zhao, J. F. (2009). Nitrification performance and biofilm development of co- and counter-diffusion biofilm reactors: Modeling and experimental comparison. *Water Research*, 43, 2699–2709. DOI: 10.1016/j.watres.2009.03.017.
- Wei, D., Xue, X. D., Yan, L. G., Sun, M., Zhang, G., Shi, L., & Du, B. (2014). Effect of influent ammonium concentration on the shift of full nitrification to partial nitrification in a sequencing batch reactor at ambient temperature. *Chemical Engineering Journal*, 235, 19–26. DOI: 10.1016/j.cej.2013.09.005.
- Zekker, I., Rikmann, E., Tenno, T., Menert, A., Lemmiksoo, V., Saluste, A., Tenno, T., & Tomingas, M. (2011). Modification of nitrifying biofilm into nitrifying one by combination of increased free ammonia concentrations, lowered HRT and dissolved oxygen concentration. *Journal of Environmental Sciences*, 23, 1113–1121. DOI: 10.1016/S1001-0742(10)60523-2.
- Zhou, Y., Oehmen, A., Lim, M., Vadivelu, V., & Ng, W. J. (2011). The role of nitrite and free nitrous acid (FNA) in wastewater treatment plants. *Water Research*, 45, 4672–4682. DOI: 10.1016/j.watres.2011.06.025.

3.3 Publikovaná práce č. 3

Radechovska H, Svehla P, Radechovsky J, Pacek L, Balik J. 2017. The influence of temperature fluctuation on the stability of partial nitrification applied for reject water treatment. *Environment Protection Engineering* **43**:87 – 99.

HELENA RADECHOVSKA¹, PAVEL SVEHLA¹,
JOSEF RADECHOVSKY¹, LUKAS PACEK¹, JIRI BALIK¹

THE INFLUENCE OF TEMPERATURE FLUCTUATION ON THE STABILITY OF PARTIAL NITRITATION APPLIED FOR REJECT WATER TREATMENT

The influence of sudden and gradual temperature fluctuations on the stability of partial nitrification applied for the treatment of reject water containing ammonium nitrogen ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) in the range of 1000–1400 mg/dm^3 was investigated. It was found that a sudden decrease in temperature from 24.3 °C to 14.3 °C and 15.8 °C significantly affected the stability of the process. No negative effect was recorded after a sudden temperature decrease from 24.3 to 17.4 °C. It was also found that during a gradual temperature decrease from 24.3 °C, process stability was negatively affected at 12.7 °C.

1. INTRODUCTION

Nitrogen removal during wastewater treatment is traditionally ensured by the biological process of nitrification/denitrification. In some cases, the application of this method is complicated; the treatment of effluent with a low concentration ratio of COD:N is especially problematic. Multiple innovative biological methods have been implemented in order to treat these types of wastewater. These methods are based on the accumulation of nitrite during the nitrification process. The procedures include a process of nitrification/denitrification and of partial nitrification combined with anaerobic ammonium oxidation (anammox). Nitrification/denitrification is based on the fact that under specific conditions it is possible to stop N-ammon oxidation by controlling nitrite levels. Under ideal operational conditions, it is possible to reduce up to 25% of the oxygen consumed/needed during nitrification as compared with nitrification, and up to 40%

¹Department of Agro-Environmental Chemistry and Plant Nutrition, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, CULS in Prague, Kamycka 129, Prague 6 – Suchbøl, 165 21, e-mail: hrncirovahn@af.czu.cz

of organic substrate during denitrification as compared with denitrification, resulting in a faster process and a reduced volume of grown biomass [1, 2].

Another innovative biological method is an anammox process based on a microbial-mediated reaction between nitrite ions produced during nitrification and ammonium ions remaining in the treated water. Elemental nitrogen is generated during this process [3–5]. No organic carbon is needed for the satisfactory operation of the anammox process. Simultaneously, the process requires a theoretical 1:1.32 ratio of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ to $\text{NO}_2^-\text{-N}$. Correspondingly, only ca. 60% of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ should theoretically be converted to $\text{NO}_2^-\text{-N}$, meaning partial nitrification is needed as a first stage for subsequent anammox [6, 7]. In contrast, for efficient nitrification/denitrification it is necessary to transform all $\text{NH}_4^+\text{-N}$ into $\text{NO}_2^-\text{-N}$ before its reduction to dinitrogen gas. Therefore, oxygen demand is significantly lower for partial nitrification/anammox compared to nitrification/denitrification. Both processes could be operated in a one-step setup or in two separated reactors (one for nitrification/partial nitrification and one for denitrification or anammox [8–13]). Reject water arising during the thickening and dewatering of digested sludge, which is characterized by very high $\text{NH}_4^+\text{-N}$ concentrations, is a typical wastewater suitable for the application of the methods mentioned above [8]. Nitrite accumulation, which is the basis for nitrification and partial nitrification, may be stimulated by intervening with the nitrification system in a way that suppresses nitrite oxidizing bacteria (NOB) while preserving the function of ammonia oxidizing bacteria (AOB). The aim is to get the biomass to a point at which the activity of AOB exceeds the activity of NOB. The main factors that can be used to stop the nitrification on nitrite level are limited concentration of dissolved oxygen [14, 15] or low sludge age [16]. Nitrification or partial nitrification is successfully achieved in the sequencing batch reactor (SBR) thanks to strong fluctuations of free ammonia (FA) and free nitrous acid (FNA) concentrations [9, 17]. These chemical substances selectively inhibit NOB activity in a specific concentration range [18–20].

Temperature is an important factor affecting the nitrification process on a number of counts. Nitrifying organisms are generally very sensitive to temperature; optimum levels lie in the range of 28–32 °C. With a temperature decrease of 10 °C, the nitrification rate decreased by ca. 50% [21]. Higher temperatures facilitate the accumulation of nitrite [22]. The combined effect of high temperature with sludge retention time (SRT) limitation is the principle of the single reactor system for high activity ammonium removal over nitrite (SHARON) process [8]. Current systems of separate biological treatment of reject water based on the accumulation of nitrites are usually operated at a temperature in the range of ca. 30–40 °C [8, 23]. Reject water is characterized by high temperatures, but from a technological point of view it can be difficult to maintain temperatures within the required/ideal range during the winter. Any heating of the reactor significantly deteriorates the economy of the process. Therefore, it seems appropriate to look for technological alternatives that do not require temperature control [24]. The possibility of operating high nitrogen loaded SBR systems treating reject water at relatively

low temperatures has been previously confirmed. Partial nitrification with flocculent biomass was successfully applied at 23 ± 2 °C [17] for this purpose. This value seems to be sustainable throughout most seasons thanks to the high temperature of raw reject water produced during the thickening and dewatering of sludge digested under mesophilic or thermophilic conditions [25]. However, it is necessary to consider the effects of temporary drops below these values during the winter, and the stability of partial nitrification (and full nitrification as well) after significant decreases in temperature may be disrupted in the case of particularly strong fluctuations in temperature.

This work aimed to evaluate partial nitrification temperature resistance during separate reject water treatment applied in a system using flocculent biomass operated on the SBR principle. Based on [17], 25 °C was selected as an adjusted starting temperature value, where the effect of sudden temperature decreases with variable intensity on process stability was assessed. Simultaneously, the determination of the minimal temperature value enabling satisfactory operation of the system was also an aim of this study. Tests simulating slow temperature decreases from an initial adjusted temperature of 25 °C were realized for this purpose.

2. EXPERIMENTAL

Reactor set-up. A laboratory model of a nitrifying reactor made of plastic (0.75 dm³ in volume) was operated with flocculent biomass cultivated in the form of activated sludge. The model was placed in a thermostatic box with the aim of ensuring optimal conditions for temperature control. Peristaltic pumps and silicone tubes were used for the transport of treated water into the reactor. The reactor was aerated using the coarse bubble system. It was operated on the SBR principle with two 12 hour cycles per day. Each cycle consisted of the following repeated phases: inflow of treated water into the reactor (ca. 10 min), the working phase, when the reactor volume was aerated (11 h 20 min), sedimentation (ca. 20 min), and drainage of reject water from the reactor (ca. 10 min). Based on the results of previous tests [9, 17], the system described above was selected as a suitable technological arrangement for the effective partial nitrification of reject water. The nitrogen loading rate (NLR) was maintained at 0.2 kg/(m³·d). The concentration of dissolved oxygen in the reactor was not limited: at the beginning of the cycle the concentration was 6.1 mg O₂/dm³ on average and at the end of the cycle it was 7.7 mg O₂/dm³ on average. The pH value was not controlled. The concentration of volatile suspended solids (VSS) ranged between 0.25 and 3 g/dm³. The stability of the partial nitrification process after the temperature changes was evaluated based mainly on the changes in pH and representation of nitrogen compounds in the effluent.

Treated water. Reject water from the Central Waste Water Treatment Plant in Prague was used. Its quality parameters are shown in Table 1.

Table 1

Composition of reject water

Parameter	Average	Range
pH	8.4	8.1–8.7
Alkalinity, mmol/dm ³	93	70–121
P total, mg P/dm ³	37	23–63
NH ₄ ⁺ -N, mg NH ₄ ⁺ /d	1336	985–1734
COD, mg O ₂ /dm ³	2700	1145–4600
COD soluble, mg O ₂ /dm ³	1532	770–2322
TSS, g/dm ³	3.3	2.1–5.5

The method of temperature changes. The laboratory model described above was operated for 392 days. The operational time was divided into 8 periods (1–8). A schedule of temperature changes during the experiment is shown in Table 2.

Table 2

Schedule of changes of temperature during the experiment

Operational period	Days	Adjusted temperature [°C]	Real temperature [°C]	
			Range	Average
1	0–13	25	24–24.7	24.3
2	14–46	15	14.1–14.5	14.3
3	47–171	25	24–24.7	24.3
4	172–192	18	17.1–17.6	17.4
5	193–228	25	24–24.7	24.3
6	229–276	16.5	15.5–15.9	15.8
7	277–360	25	24–24.7	24.3
8	361–392	(25→13)	12.7–24.3	–
	361	23	–	22.4
	362	21	–	20.3
	363	19	–	18.4
	364–371	17	16.2–16.4	16.3
	372–375	15	14.2–14.6	14.4
	376–392	13	12.5–12.9	12.7

During this time the temperature in the system was suddenly changed several times (operational periods 1–7). The value of 25 °C was selected as an initial adjusted temperature (period 1) in accordance with the conditions applied within previous tests [17]. During periods 2, 4, and 6, sudden drops in temperature with variable intensities (one by one to 15, 18 and 16.5 °C) were simulated with the aim of determining the maximum

intensity of temperature decrease the system is able to accept without significantly decreasing the stability of the treatment process under the given conditions. Within periods 3, 5 and 7, the temperature was restored to the original value (25 °C) with the aim of stabilising the process at this temperature before another simulated drop. In the last period of the experiment (period 8, days 361–392), the temperature was decreased gradually with the aim of determining the minimum temperature enabling satisfactory operation of the tested system under the given conditions.

The duration of particular periods was selected with respect to the stability of the treatment process before changes to the temperature regime. Therefore, significant differences can be recorded between the duration of particular periods. Period 1 lasted only 13 days due to the fact that the system was operated under comparable conditions for a period of one month before the initiation of period 1. The only difference was that temperature was based on actual temperature in the laboratory (23±2 °C) instead of artificial control in the thermostatic box. The standard duration of individual periods was around 1 month. However, in cases where significant disruption to process stability was recorded after a radical fall in temperature during particular periods, the operational time was extended (e.g. period 6). Simultaneously, the operational time within periods with the initial temperature of 25 °C (periods 3 and 7) was significantly extended in cases where process stability was disrupted by radical temperature falls within the previous periods with the aim of stabilizing the intensity and performance of the treatment process to levels comparable with period 1.

Real temperature values measured in the reactor differed to a certain extent from adjusted values in the thermostatic box. Simultaneously, the results proved that relatively minimal differences between actual values of temperature may result in significant changes to process stability. Therefore, real average temperature values, with accuracy to tenths of °C, are presented throughout the whole text of this paper (Table 2).

Analytical methods. The spectrophotometric measurement of various forms of nitrogen ($\text{mg NH}_4^+/\text{dm}^3$, NO_2^- -N, NO_3^- -N) and chemical oxygen demand (COD) was performed using a HACH (Hach Lange GmbH, Germany) DR/4000 photometer, and total suspended solids (TSS) and volatile suspended solids (VSS) were determined gravimetrically. All measurements were performed according to Standard Methods [26]. P-total concentration was determined with a HACH DR/4000 photometer by HACH method No. 8190. Alkalinity was determined by titration of the sample with hydrochloric acid ($0.1 \text{ mol}/\text{dm}^3$) up to pH 4.5. Temperature, pH and dissolved oxygen concentration were measured by WTW instruments pH 340i and oxi 340i (WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Germany). The pH value was continuously monitored using a GRYF sensor PCI 321 (GRYF HB, Czech Republic).

Calculations. The concentrations of FA (C_{FA}) and FNA (C_{FNA}) were calculated in accordance with Anthonisen et al. [18] and Park and Bae [27]:

$$C_{FA} = \frac{17}{14} \frac{10^{\text{pH}} C_{\text{NH}_4^+-\text{N}}}{\exp\left(\frac{6334}{273+T}\right) + 10^{\text{pH}}} \left[\text{mg}/\text{dm}^3 \text{NH}_4^+-\text{N} \right] \quad (1)$$

$$C_{FNA} = \frac{47}{14} \frac{C_{\text{NO}_2^--\text{N}}}{\left(\exp\left(-\frac{2300}{273+T}\right) + 10^{\text{pH}}\right) + 1} \left[\text{mg}/\text{dm}^3 \text{HNO}_2 \right] \quad (2)$$

where $C_{\text{NH}_4^+-\text{N}}$ and $C_{\text{NO}_2^--\text{N}}$ represent the actual total concentrations of NH_4^+-N and NO_2^--N , respectively, and T is the temperature in centigrade scale.

Representations of $[\text{NO}_2^--\text{N}]$ and $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ (%) were calculated using $C_{\text{NO}_2^--\text{N}}$ and $C_{\text{NO}_3^--\text{N}}$ concentration in mg/dm^3

$$[\text{NO}_2^--\text{N}] = 100 \frac{C_{\text{NO}_2^--\text{N}}}{C_{\text{NO}_2^--\text{N}} + C_{\text{NO}_3^--\text{N}}} \quad (3)$$

$$[\text{NO}_3^--\text{N}] = 100 \frac{C_{\text{NO}_3^--\text{N}}}{C_{\text{NO}_2^--\text{N}} + C_{\text{NO}_3^--\text{N}}} \quad (4)$$

3. RESULTS AND DISCUSSION

Evaluation of process stability according to pH value. The pH value is a good indicator of short-cut nitrification process stability under the conditions applied within the described experiment. The activated sludge mixture is acidified as a consequence of AOB activity during the nitrification process when applied to high nitrogen loaded wastewater [21]. As a consequence, significant pH fluctuations can be recorded during the operational cycle of our SBR system treating reject water in cases where stable partial nitritation took place in this system in accordance with [17].

During the operation of the reactor at 24.3 °C (operational periods 1, 3, 5 and 7), pH in the reactor ranged between 6.9 and 7.9 at the beginning of the SBR cycle and between 4.7 and 6.5 at its end (Fig. 1). These relatively large differences indicate intensive AOB activity and stable partial nitritation. However, after a sudden decrease in temperature from 24.3 °C to 14.3 °C (day 14, operational period 2), a rapid increase in pH to 8.9 was monitored, while no significant differences in pH were recorded during the SBR cycle between days 21 and 41. As late as day 42 (28 days after the start of

period 2), pH at the beginning and at the end of the cycle started to differ again. This indicates a disruption to partial nitrification stability and its gradual return to the original intensity during period 2. A similar development related to pH was recorded during operational period 6 after a decrease in temperature to 15.8 °C. After a decrease in temperature from 24.3 °C to 17.4 °C (operational period 4), this effect was not observed (Fig. 1). During the gradual decrease in temperature from 24.3 °C (operational period 8), the difference between pH at the beginning and at the end of the cycle was reduced with a falling temperature. However, significant differences between the start and end of the cycle were monitored until a temperature of 12.7 °C was reached. Under these conditions, on day 392 pH ranged between 8.8 and 8.9 throughout the entire day, indicating a disruption to process stability. Therefore, no additional decreases in temperature were realized within phase 8 and the experiment was terminated.

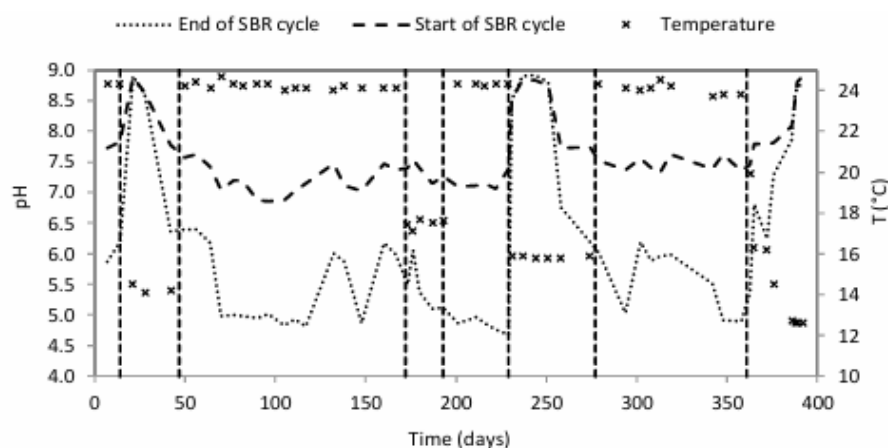


Fig. 1. pH at the beginning and at the end of the SBR cycle during operational periods 1–8

Evaluation of process stability according to the concentrations of nitrogen compounds in the effluent. NO_2^- -N is the final product of partial nitrification. Therefore, its actual concentration in the effluent can be considered a suitable parameter for evaluating the stability of partial nitrification. Simultaneously, the ratio of NO_2^- -N to NH_4^+ -N concentration can be used for this purpose. The alkalinity of used reject water enables the conversion of ca. 50–60% of NH_4^+ -N contained in the reject water to NO_2^- -N without pH control so long as the process is not limited by other factors [9]. Considering the fact that NH_4^+ -N was converted primarily to NO_2^- -N without intensive NO_3^- -N production, a significant decrease of the NO_2^- -N: NH_4^+ -N ratio below 1.0 may indicate a decrease in AOB activity. Under these conditions, the disruption of partial nitrification stability may be signalled by a decrease in the NO_2^- -N: NH_4^+ -N ratio.

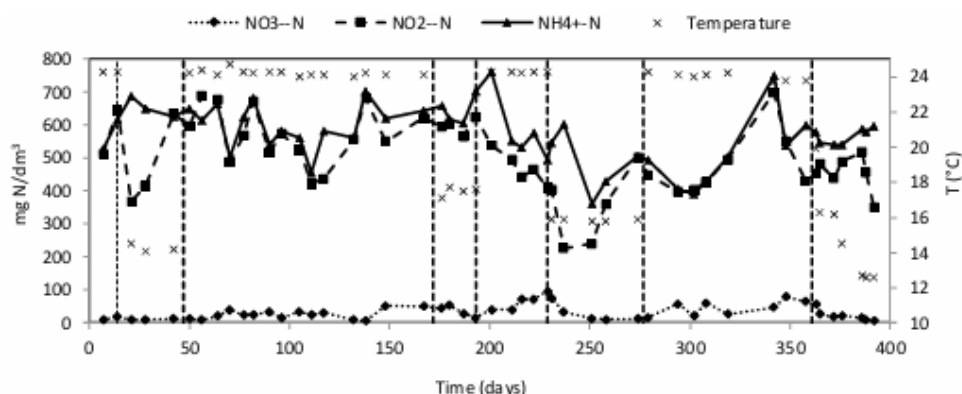


Fig. 2. The concentrations of different nitrogen species in the effluent during operational periods 1–8

NO_2^- -N concentration ranged between 230 and 680 mg/dm^3 throughout the entire reactor operation (Fig. 2). The lowest concentrations were recorded after a temperature decrease at operational periods 2 and 6, indicating instability of the treatment process. Consequently, the amount of NO_2^- -N in the reactor effluent gradually increased during these periods, indicating gradual re-activation of AOBs. Simultaneously, the average ratio of NO_2^- -N to NH_4^+ -N concentration was lower during operational periods 2 (0.56) and 6 (0.67) compared with periods 1 (1.0), 3 (0.95), 5 (0.81) and 7 (0.95). No significant changes in concentration of nitrogen species were recorded during period 8 until day 388. However, a decrease in NO_2^- -N from 520 to 352 mg/dm^3 (Fig. 2) and simultaneous fall of the ratio of NO_2^- -N to NH_4^+ -N concentration from 0.92 to 0.59 was observed after the decrease in temperature to 12.7 °C between days 386 and 392.

Unexpectedly, the above mentioned decreases in NO_2^- -N concentration after temperature falls (periods 2, 6 and end of period 8) were not combined with an obvious simultaneous increase in NH_4^+ -N concentration (Fig. 2). The representation of volatile FA within NH_4^+ -N increases rapidly upon increasing pH [18]. In accordance with this statement, FA concentration increased significantly during period 2, 6 and 8 (Figs. 1 and 3) and it is necessary to consider the possibility of intensive stripping of FA during these periods in an intensively aerated system. This hypothesis was confirmed by the decrease in nitrogen concentration during these phases. For example, during day 251 (period 6), total inorganic nitrogen concentration in the effluent (the sum of NH_4^+ -N, NO_2^- -N and NO_3^- -N) reached 620 $\text{mg N}/\text{dm}^3$ at an NH_4^+ -N input concentration of 1020 $\text{mg NH}_4^+/\text{dm}^3$ indicating that almost 40% of the nitrogen was stripped out. Simultaneously, no significant nitrogen loss was observed during the stable partial nitritation (e.g. periods 1, 3 and 5). Considering the fact that ammonia was removed not only by partial nitritation but also by an additional mechanism during the selected periods of reactor operation, NH_4^+ -N

removal efficiency seems not to be sufficiently objective for the purpose of comparing partial nitrification stability during individual periods of reactor operation.

FA and FNA concentrations and their effect on the treatment process. Development of FA and FNA concentrations during the experiment is recorded in Figs. 3 and 4.

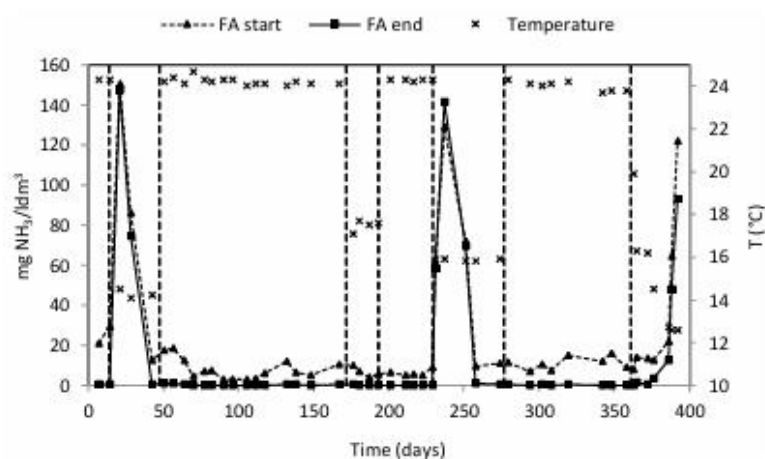


Fig. 3. Concentration of FA at the beginning and at the end of the SBR cycle

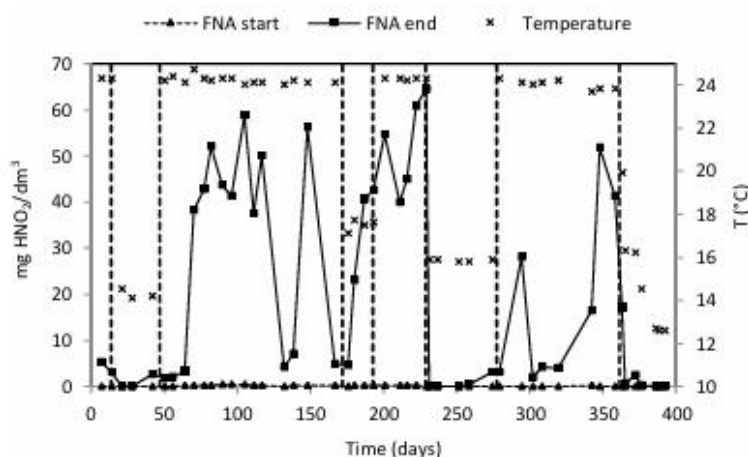


Fig. 4. Concentration of FNA at the beginning and at the end of the SBR cycle

FA concentration reached its maximum at the beginning of the SBR cycle (3–20 mg NH₃/dm³), while FNA concentration increased during the cycle, reaching its maximum at the end of the cycle (up to 61 mg HNO₂/dm³) in the case of stable operation of partial nitrification in accordance with [17]. NOB activity was suppressed due to FA and/or FNA

inhibition, while AOB activity was preserved under these conditions thanks to their higher resistance [18]. An interesting observation is that the activity of AOB was also sufficient for successful partial nitrification at extremely high values of FNA at the end of the cycle in periods 3, 5 and 7 (Fig. 4). This could be caused by the adaptation of the microorganisms to the prevailing conditions within the reactor [1]. On the other hand, the finding that only ca. 50% of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ was removed by AOB during periods with stable partial nitrification (periods 1, 3, 4, 5, 7) indicates that AOB were in some way inhibited at a certain FNA concentration with pH gradually decreasing and FNA concentration gradually increasing during the SBR cycle. Consequently, they were probably reactivated at the beginning of the subsequent cycle in connection with a pH increase and simultaneous FNA concentration decrease. This hypothesis is in accordance with the results of literature source [28] evaluating the effect of pH and FNA on the activity of AOB in a partial nitrification reactor. Significant increases in pH throughout the whole cycle of the SBR recorded during selected phases of periods 2, 6 and 8 (Fig. 1) resulted in an extreme increase in FA concentration. For example, as much as 150 mg/dm^3 FA was measured on day 21 (period 2, Fig. 3). Therefore, AOB activity limited primarily by a decrease in temperature was also inhibited secondarily by FA [18]. This probably prolonged the period required for the recovery of satisfactory AOB activity during phases 2 and 6. A significant increase in FA concentration (up to $122 \text{ mg NH}_3/\text{dm}^3$ at the beginning of the cycle) was also detected after the decrease in temperature to $12.7 \text{ }^\circ\text{C}$ realised within period 8, resulting in a similar secondary inhibition effect.

Representation of NO_2^- -N and NO_3^- -N within oxidized forms of nitrogen. NO_2^- -N represented 86–98% of oxidized nitrogen (the sum of NO_2^- -N and NO_3^- -N) in the effluent from the reactor for the whole reactor operation. This suggests effective and long-term restriction of NOB activity. The literature generally indicates the accumulation of nitrites is supported by higher temperatures [29]. However, even the temperature decreases

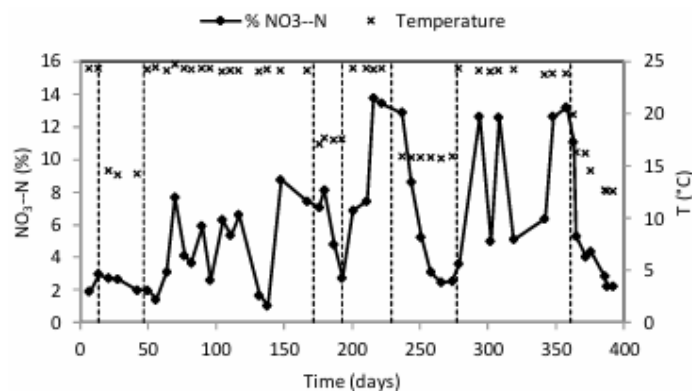


Fig. 5. Representation of NO_3^- -N between oxidized forms of nitrogen

realized within periods 2, 4, 6 and 8 did not induce a significant increase in NO_3^- -N effluent concentration within this study. To the contrary, the representation of NO_3^- -N between nitrogen oxidized forms decreased with decreasing temperatures (Fig. 5). Simultaneously, a certain increase in the representation of NO_3^- -N within oxidized nitrogen, indicating an undesirable increase of NOB activity, was repeatedly recorded after temperature increases (periods 3, 5, 7) compared to previous periods with decreased temperature (periods 2, 4, 6). For example, the representation of NO_3^- -N increased from 3 to 14% during period 5 (Fig. 5). The strong inhibition of NOB activity (due to extreme FA concentration increases during periods 2, 6 and 8 and consequently decreases during periods 3, 4, 5 and 7) could be the main factor causing this fact. Also, the faster growth rate of NOB under higher temperatures [30] could support this phenomenon. In all cases, the representation of NO_3^- -N within oxidized forms of nitrogen did not exceed 14% during the whole reactor operation time and the fluctuation of NO_3^- -N representation had no fatal effect on the process performance.

4. CONCLUSIONS

It was found that a sudden decrease in temperature from 24.3 °C to 17.4 °C did not affect the stability of partial nitritation used for reject water treatment under the conditions applied within the described experiment, indicating relatively good temperature stability within the tested system. In addition, during a gradual temperature decrease, the system was stable until 12.7 °C. Based on these findings, the operation of full-scale reactors treating reject water without temperature control under the conditions described in this study seems to be achievable. Quick decreases in temperature from 24.3 °C to 14.3 and 15.8 °C caused significant disruptions to process stability indicating that too intense and sudden decreases in temperature may deteriorate the performance of the process on a relatively long-term basis, even at a temperature higher than the value acceptable in the case of its gradual decrease. The secondary inhibition effect induced by elevated concentrations of FA may support the primary restriction of AOB activity caused by a decrease in temperature with the potential to significantly prolong the phase of deteriorated function of the system. However, the ability of AOB to adapt to low temperature values was proven by gradual restoration of the stability of partial nitritation even after sudden a decrease in temperature from 24.3 to 14.3 °C. Therefore, long term operation at a lowered temperature seems to be achievable. However, the ability of AOB to adapt to low temperature were proved by gradual restoration of the stability of partial nitritation even after sudden decrease of temperature from 24.3 to 14.3 °C. Therefore, long term operation at lowered temperature seems to be achievable. The results of this paper are fully applicable for the reactors applying partial nitritation as the first stage before independent anammox reactor. Simultaneously, basic findings could

be used for the control of reactors applying full nitrification within the system for nitrification/denitrification operated in two separated reactors. For objective evaluation of temperature stability of one-step systems of nitrification/denitrification and partial nitrification/anammox additional research is needed.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the support given by the University-wide internal grant agency – CIGA, project No. 20132012.

REFERENCES

- [1] TURK O., MAVINIC D.S., *Stability of nitrite build-up in an activated sludge system*, J. WPCF, 1989, 61 (8), 1440.
- [2] ABELLING U., SEYFRIED C.F., *Anaerobic-aerobic treatment of high-strength ammonium wastewater-nitrogen removal via nitrite*, Water Sci. Technol., 1992, 26 (5/6), 1007.
- [3] MULDER A., VAN DE GRAAF A.A., ROBERTSON L.A., KUENEN J.G., *Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor*, FEMS Microbiol. Ecol., 1995, 16 (3), 177.
- [4] JETTEN M.S.M., WAGNER M., FUERST J., VAN LOOSDRECHT M., KUENEN G., STROUS M., *Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation (anammox) process*, Curr. Opin. Biotech., 2001, 12 (3), 283.
- [5] KARTAL B., KUENEN J.G., VAN LOOSDRECHT M.C.M., *Sewage treatment with anammox*, Science, 2010, 328 (5979), 702.
- [6] KARTAL B., DE ALMEIDA N.M., MAALCKE W.J., DEN CAMP H.J.M.O., JETTEN M.S.M., KELTJENS J.T., *How to make a living from anaerobic ammonium oxidation*, FEMS Microbiol. Rev., 2013, 37 (3), 428.
- [7] STROUS M., HEIJNEN J.J., KUENEN J.G., JETTEN M.S.M., *The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms*, Appl. Microbiol. Biot., 1998, 50, (5), 589.
- [8] HELLINGA C., SCHELLEN A.A.J.C., MULDER J.W., VAN LOOSDRECHT M.C.M., HEIJNEN J.J., *The SHARON process. An innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water*, Water Sci. Technol., 1998, 37 (9), 135.
- [9] JENICEK P., SVEHLA P., ZABRANSKA J., DOHANYOS M., *Factors affecting nitrogen removal by nitrification/denitrification*, Water Sci. Technol., 2004, 49 (5/6), 73.
- [10] LACKNER S., GILBERT E.M., VLAEMINCK S.E., JOSS A., HORN H., VAN LOOSDRECHT M.C.M., *Full-scale partial nitrification/anammox experiences. An application survey*, Water Res., 2014, 55, 292.
- [11] SLIEKERS A.O., DERWORT N., GOMEZ J.L.C., STROUS M., KUENEN J.G., JETTEN M.S.M., *Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor*, Water Res., 2002, 36, 2475.
- [12] VAN DONGEN U., JETTEN M.S.M., VAN LOOSDRECHT M.C.M., *The SHARON[®]-Anammox[®] process for treatment of ammonium rich wastewater*, Water Sci. Technol., 2001, 44 (1), 153.
- [13] VAN KEMPEN R., MULDER J.W., UIJTERLINDE C.A., LOOSDRECHT M.C.M., *Overview. Full scale experience of the SHARON[®] process for treatment of rejection water of digested sludge dewatering*, Water Sci. Technol., 2001, 44 (1), 145.
- [14] RUIZ G., JEISON D., CHAMY R., *Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration*, Water Res., 2003, 37 (6), 1371.
- [15] JIANLONG W., NING Y., *Partial nitrification under limited dissolved oxygen conditions*, Proc. Biochem., 2004, 39 (10), 1223.

- [16] POLLICE A., TANDOI V., LESTINGI C., *Influence of aeration and sludge retention time on ammonium oxidation to nitrite and nitrate*, Water Res., 2002, 36 (10), 2541.
- [17] SVEHLA P., BARTACEK J., PACEK L., HRNCIROVA H., RADECHOVSKY J., HANC A., JENICEK P., *Inhibition effect of free ammonia and free nitrous acid on nitrite-oxidising bacteria during sludge liquor treatment. Influence of feeding strategy*, Chem. Pap., 2014, 68 (7), 871.
- [18] ANTHONISEN A.C., LOEHR R.C., PRAKASAM T.B.S., SRINATH E.G., *Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid*, J. Water Poll. Contr. Fed., 1976, 48 (5), 835.
- [19] BLACKBURN R., YUAN Z., KELLER J., *Demonstration of nitrogen removal via nitrite in a sequencing batch reactor treating domestic wastewater*, Water Res., 2008, 42 (8/9), 2166.
- [20] PAMBRUN V., PAUL L., SPÉRANDIO M., *Control and modelling of partial nitrification of effluents with high ammonia concentrations in sequencing batch reactor*, Chem. Eng. Proc., 2008, 47 (3), 323.
- [21] HENZE M., VAN LOOSDRECHT M.C.M., EKAMA G., BRDJANOVIC D., *Biological wastewater treatment: principles, modelling and design*, IWA Publishing, London 2008.
- [22] KIM J.-H., GUO J., PARK H.-S., *Comparison study of the effects of temperature and free ammonia concentration on nitrification and nitrite accumulation*, Process Biochem., 2008, 43 (2), 154.
- [23] VOLCKE E.I.P., LOCCUFIER M., VANROLLEGHEM P.A., NOLDUS E.J.L., *Existence, uniqueness and stability of the equilibrium points of a SHARON bioreactor model*, J. Process Control, 2006, 16 (10), 1003.
- [24] RODRÍGUEZ D.C., PINO N., PEÑUELA G., *Monitoring the removal of nitrogen by applying a nitrification-denitrification process in a sequencing batch reactor (SBR)*, Biores. Technol., 2011, 102 (3), 2316.
- [25] LÓPEZ-PALAU S., SANCHO I., PINTO A., DOSTA J., MATA-ÁLVAREZ J., *Influence of temperature on the partial nitritation of reject water in a granular sequencing batch reactor*, Environ. Technol., 2013, 34 (18), 2625.
- [26] APHA, *Standard Methods for examination of Water and wastewater*, 19th Ed., American Publishers Health Association, Washington DC, USA, 1995.
- [27] PARK S., BAE W., *Modelling kinetics of ammonium oxidation and nitrite oxidation under simultaneous inhibition by free ammonia and free nitrous acid*, Proc. Biochem., 2009, 44 (6), 631.
- [28] CLAROS J., JIMÉNEZ E., AGUADO D., FERRER J., SECO A., SERRALTA J., *Effect of pH and HNO₂ concentration on the activity of ammonia-oxidizing bacteria in a partial nitritation reactor*, Water Sci. Technol., 2013, 67 (11), 2587.
- [29] FORD D.L., CHURCHWELL R.L., KACHTICK J.W., *Comprehensive analysis of nitrification of chemical processing wastewater*, J. Water Poll. Contr. Fed., 1980, 52 (11), 2726.
- [30] PAINTER H., *A review of literature on inorganic nitrogen metabolism in microorganisms*, Water Res., 1970, 4, 395.

3. 4 Publikovaná práce č. 4

Radechovska H, Svehla P, Radechovsky J, Pacek L, Balik J. 2017. High-performance system for partial nitrification of reject water resistant to temperature fluctuation. *Chemical Papers* **71**:1657–1668.

High-performance system for partial nitrification of reject water resistant to temperature fluctuation

Helena Radechovska¹ · P. Svehla¹ · J. Radechovsky¹ · L. Pacek¹ · J. Balik¹

Received: 28 July 2016 / Accepted: 7 March 2017 / Published online: 18 March 2017
© Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences 2017

Abstract A sequencing batch reactor (SBR) applying partial nitrification for reject water treatment was operated for 330 days at a laboratory scale. The system was repeatedly exposed to sudden temperature drops from 24 to 17 °C. The nitrogen loading rate (NLR) was increased incrementally from 0.4 to 1.5 kg/(m³ day) with the aim to evaluate temperature stability of the process at different NLR value. Total nitrite nitrogen (TN^{III}N) represented 94–99% of oxidised nitrogen in the effluent throughout the entire operation of the reactor. It was found that the pH profile during the SBR cycle, nitrogen removal efficiency and concentration of N-species in the effluent did not show significant changes following temperature decreases occurring within the entire applied range of the NLR. Simultaneously, the nitrogen removal rate increased proportionally with the NLR where the nitrogen oxidation efficiency reached 48–58% regardless of actual temperature and NLR. These observations clearly demonstrate the temperature stability of applied partial nitrification system during the tested temperature fluctuations.

Keywords Nitrite accumulation · Sequencing batch reactor · Partial nitrification · Temperature fluctuation

Introduction

Nitrification/denitrification and partial nitrification/anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX), have been frequently applied to reject water treatment in laboratories, pilot plants and full-scale conditions within the past few decades (Hellinga et al. 1998; van Dongen et al. 2001; van Kempen et al. 2001; Jenicek et al. 2004; Zekker et al. 2012; Lackner et al. 2014; Torà et al. 2014). The nitrification applied as the first stage for subsequent ANAMMOX process should be operated with the aim to convert partially total ammonia nitrogen (the sum of N-NH₄⁺ and N-NH₃, TAN) to total nitrite (trivalent) nitrogen (the sum of N-NO₂⁻ and N-HNO₂, TN^{III}N) where suitable ratio of TN^{III}N/TAN concentration enabling satisfactory course of ANAMMOX process should be achieved (van Dongen et al. 2001; Zekker et al. 2012). Therefore, the term “partial nitrification” was established for these cases. Nitrification/denitrification as well as partial nitrification/ANAMMOX is based on the accumulation of nitrites induced by the selective inhibition of nitrite oxidising bacteria (NOB) during the nitrification process, whereby ammonia oxidising bacteria (AOB) activity is preserved. The main advantages of the above-mentioned processes include high effectiveness and the reduced costs of aerating and organic substrates, as compared to a traditional nitrification/denitrification system (Turk and Mavinic 1989; Mulder et al. 1995). Suppression of NOB activity can be achieved by a dissolved oxygen (DO) limitation (Ruiz et al. 2003; Ge et al. 2014; Pacek et al. 2015) or by the application of a short sludge retention time (SRT) at high temperature (Hellinga et al. 1998). Nitrification as well as partial nitrification during reject water treatment may be successfully achieved in a sequencing batch reactor (SBR) thanks to strong fluctuations in free ammonia (FA) and free nitrous acid (FNA) concentrations (Jenicek et al. 2004; Park and Bae 2009; Svehla et al. 2014). These chemical substances selectively inhibit

✉ Helena Radechovska
helena.hrncirova@seznam.cz

¹ Department of Agro-environmental Chemistry and Plant Nutrition; Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences in Prague, Kamýcka 129, Suchbátol, Prague 6 165 21, Czech Republic

NOB activity within a specific concentration range (Anthonisen et al. 1976; Vadivelu et al. 2007; Blackburne et al. 2008; Pambrun et al. 2008).

Temperature is an important factor affecting the nitrification process in a number of ways. Nitrifying organisms are generally highly sensitive to temperature. Thus, the productivity of nitrification (and partial nitrification as well) is strongly temperature-dependent. On the other hand, also the possibility to operate satisfactory biological systems applying nitrification at low temperature was proved in the past (Daija et al. 2016). Higher temperatures support the accumulation of nitrite during the nitrification process under specific conditions (Hellinga et al. 1998; Hao et al. 2002; Kim et al. 2008). At the same time, the temperature value significantly affects the distribution of FA and FNA (Park and Bae 2009; Anthonisen et al. 1976). Therefore, a change in temperature may influence the inhibition of nitrifying bacteria during high nitrogen loaded wastewater treatment, even at stable TAN and $\text{TN}^{\text{NH-N}}$ concentrations. The combined effect of high temperatures and SRT limitation is the principle of the Single reactor system for High activity Ammonium Removal Over Nitrite (SHARON) process (Hellinga et al. 1998). Current systems for separate biological treatment of reject water applying nitrification/denitrification, or partial nitrification/ANAMMOX are usually operated at 30–40 °C (Hellinga et al. 1998; Lackner et al. 2014; Volcke et al. 2006). Potential temperature fluctuations may affect the stability of the partial nitrification process due to the relatively high temperature sensitivity of AOB (Henze et al. 2008; Hrnčirova et al. 2017), but heating the reactor significantly deteriorates the economy of the process. Therefore, it seems appropriate to look for technological alternatives that do not include temperature control (Rodríguez et al. 2011; Hu et al. 2013). Positively, partial nitrification with flocculent biomass at temperatures of 23 ± 2 °C was successfully operated during experiments performed by Svehla et al. (2014) indicating the possibility of applying lower temperatures for this process under specific conditions. Relatively high temperatures are typical for reject water arising during the thickening and dewatering of anaerobically digested sludge thanks to mesophilic or thermophilic conditions prevailing in the digesters. However, from a technological point of view, it may still be difficult to achieve temperatures exceeding 20 °C, for example, during the winter season in many regions. Additionally, actual temperature of raw reject water is influenced also by dewatering unit applied within the sludge management of particular wastewater treatment plant. For example, belt press with high portion of flush water produces colder reject water than centrifuge. Kouba et al. (2014) demonstrated that wastewater containing TAN in concentrations of up to 600 mg/L may be satisfactorily treated by partial nitrification in a SBR using biomass

cultivated in the form of biofilm at 15 ± 1 °C and at a nitrogen loading rate (NLR) reaching 0.2 kg/(m³ day). Svehla et al. (2015) confirmed that also the biomass cultivated in the form of activated sludge is able to ensure satisfactory operation of partial nitrification under conditions identical with Kouba et al. (2014). However, the biomass was exposed to low temperatures for a long time and the potential effect of large temperature fluctuations was not evaluated. In addition, the ability of the system to be operated at a higher NLR was not studied. Persson et al. (2014) confirmed the possibility of applying the partial nitrification/ANAMMOX process to reject water treatment in a moving bed biological reactor (MBBR) at even lower temperatures. In their experiment, the temperature was decreased from 19 to 10 °C in three steps. The NLR was reduced during the operation of the reactor in order to achieve satisfactory TAN removal efficiency. The system was stable within the temperature range of 19 and 13 °C. At 10 °C, unstable TAN removal was registered. Different authors have applied nitrification or partial nitrification without temperature control, reaching certain ranges of operational temperature depending on the ambient temperature during the treatment of reject water or other types of wastewater with similar properties (Jenicek et al. 2004; Svehla et al. 2014; Yang et al. 2010; Wei et al. 2014).

The economy of the process is strongly affected by the nitrogen oxidation rate (NOR) guaranteed by the system. Jenicek et al. (2004) observed that during long-term operation at 21 ± 1 °C, it is possible to maintain efficient partial nitrification of reject water in a SBR using flocculent biomass at a relatively high nitrogen loading rate of up to 1.65 kg/(m³ day). Intensive fluctuation of FA and FNA concentration during SBR cycle was identified as the main factor restricting NOB activity in the experiments performed by Svehla et al. (2014) in a system with analogic technological arrangements operated at 23 ± 2 °C. Yang et al. (2010) achieved highly stable performance of partial nitrification applied to reject water treatment with the maximum NLR reaching even 4.2 kg/(m³ day) at slightly higher temperatures (26 ± 4 °C). Subsequent studies proved that the SBR treating reject water under conditions comparable with Jenicek et al. (2004) and Svehla et al. (2014) is able to be sufficiently operated after a sudden fall in temperature from 24 to 17 °C, in the case that relatively low NLR reaching 0.2 kg/(m³ day) is applied. Contrarily, the collapse of biological processes was observed after decreasing the temperature from 24 to 16 °C at the same NLR (Hrnčirova et al. 2017). However, the function of the system after the intensive temperature falls at higher NLR was still not evaluated. Thus, the productivity of the system under fluctuating temperatures is still unknown.

The aim of the experiments presented within this paper is to evaluate the influence of NLR on the temperature

resistance of the system treating reject water by partial nitrification, which is a potential precursor to denitrification via nitrite or ANAMMOX process. The research was performed under technological conditions analogical to our previous studies (Jenicek et al. 2004; Svehla et al. 2014; Hrnčirova et al. 2017). The system was repeatedly exposed to a sudden temperature fall from 24 to 17 °C where NLR was increased incrementally from 0.4 to 1.5 kg/(m³ day). The starting temperature (24 °C) was selected because it represented the upper limits of the temperature applied by Jenicek et al. (2004) and Svehla et al. (2014) during previous experiments. Temperature decreases to 17 °C were realized based on the findings presented by Hrnčirova et al. (2017). The range of NLR tested was selected with the aim to evaluate the temperature stability of the system at NLR exceeding value 0.2 kg/(m³ day) and approaching 1.65 kg/(m³ day) achievable at a relatively constant temperature under comparable conditions (Jenicek et al. 2004). Thus, the ability of the system to be highly productive under temperature fluctuation was feasible to evaluate.

Theoretical

The concentrations of FA (C_{FA}) and FNA (C_{FNA}) were calculated in accordance with Park and Bae (2009) and Anthonisen et al. (1976):

$$C_{FA}(\text{mg/L NH}_3) = \frac{17}{14} \frac{C_{TAN} \cdot 10^{\text{pH}}}{[\exp(6334/(273 + T) + 10^{\text{pH}})]} \quad (1)$$

$$C_{FNA}(\text{mg/L HNO}_3) = \frac{47}{14} \frac{C_{TN^{\text{III}}N}}{[\exp(-2300/(273 + T) + 10^{\text{pH}})] + 1} \quad (2)$$

where C_{TAN} and $C_{TN^{\text{III}}N}$ represent the actual total concentrations of TAN and TN^{III}N, respectively, and T is the temperature in degrees centigrade.

The actual value of SRT in days reached in the reactor was calculated in accordance with the Eq. (3):

$$\text{SRT} = \frac{V \cdot \text{TSS}_R}{Q \cdot \text{TSS}_{\text{eff}}} \quad (3)$$

where V is the volume of the reactor (0.75 L), TSS_R represents the concentration of TSS in g/L in the reactor, Q is the intensity of the feeding of the reactor (L/d) and TSS_{eff} describes TSS concentration (g/L) in the effluent.

Experimental

Reactor set-up

A poly methyl methacrylate laboratory model of a nitrifying reactor (0.75 L) with a flocculent biomass was

operated in a thermostatic box ET 619-4 (Lovibond, Germany) for 330 days (Fig. 1). The experiment was realized in the period lasting from January to November 2015 at non-sterile conditions. The system was inoculated with an activated sludge gained from other laboratory model treating reject water using the partial nitrification operated in SBR under the conditions described by Svehla et al. (2014). The entire volume of the reactor was filled with this activated sludge. This way, the volatile suspended solids (VSS) concentration reached 2.4 g/L at the start of the reactor operation. The inoculum was gathered from the reactor treating reject water at a laboratory temperature (23 ± 2 °C) under the conditions comparable with the experiment presented in this paper. The only difference was that the reactor serving as the source of inoculum was not placed in a thermostatic box and the temperature fluctuated in the range mentioned above. Thus, the nitrifying organisms were satisfactorily adapted to the conditions prevailing in the reactor. It enabled starting the experiment immediately after the inoculation.

The SBR was operated in two 12-h cycles per day during periods 1–8. Taking into consideration the increased volume of reject water exchanged during one cycle resulting from increase of NLR, it was impossible to apply this strategy to SBR operation during periods 9 and 10. Therefore, four cycles per day were applied during these

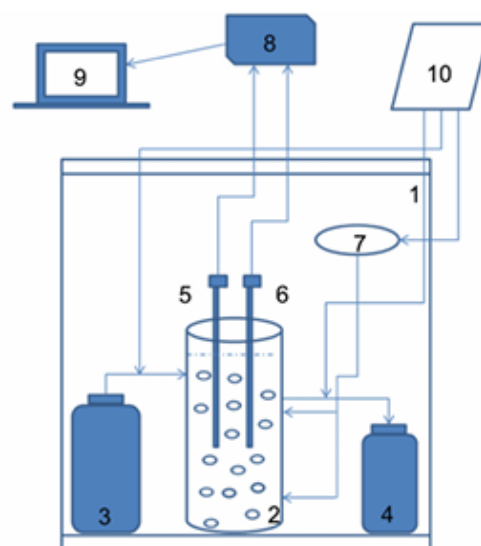


Fig. 1 Schematic diagram of SBR reactor—notes: 1 thermostatic box 2 SBR reactor, 3 reject water tank, 4 effluent water tank, 5 pH electrode, 6 DO electrode, 7 aeration, 8 interface, 9 PC, 10 electric time-switches

periods with each cycle lasting for 6 h. Each SBR cycle consisted of the following phases: inflow of treated water into the reactor (10 min); the working phase, when the reactor volume was aerated (11 h 20 min during periods 1–8; 5 h 20 min during periods 9 and 10); sedimentation (20 min); and drainage of effluent water (10 min). The duration of particular phases of SBR cycles were controlled using electric time-switches controlling the operation of peristaltic pumps and aerators.

In accordance with Jenicek et al. (2004) and Svehla et al. (2014), no excess sludge was withdrawn from the reactor, with the exception of sludge escaping with effluent water, with the aim to maintain the maximum of AOB in the reactor. The concentration of biomass expressed as total suspended solids (TSS) and VSS fluctuated in the range of 2.1 to 4.5 g/L and 1.8 to 3.0 g/L, respectively, during the whole reactor operation. The concentration of TSS in the effluent did not exceed 0.5 g/L. Under such conditions, the SRT calculated in accordance with the Eq. (3) fluctuated between 8 and 20 days.

Peristaltic pumps and silicone tubes were used to transport treated reject water into the reactor. The reactor was aerated using the coarse bubble system. A small aquarium air pump enabling the regulation of aeration intensity was used for this purpose. The volume of the reactor was intensively stirred by the supplying of the air into the reactor during the whole working phase of the reactor. The concentration of dissolved oxygen in the reactor was not limited with the aim to maximize NOR (Pacek et al. 2015). For this purpose the intensity of aeration was controlled with regard to actual NLR with the aim to achieve DO concentration exceeding 3 mg/L for the whole working phase of the cycle. As a consequence of gradual decrease of treatment process intensity during the cycle, certain increases of DO concentration were observed during the working phase of the cycle. In all cases, the concentration of DO reached an average of 3.3 and 7.8 mg/L at the beginning and at the end of working phase, respectively. Thanks to the aeration intensity control, DO concentration did not differ significantly in particular periods despite the changes of NLR applied.

Although the pH value was monitored continuously (see below), no neutralizing agents were added into the reactor. Under such conditions, pH fluctuated significantly during the SBR cycle as a consequence of the acidification of the environment during the partial nitrification process reaching maximum value at the beginning of the cycle working phase and the minimum value at the end of the working phase (Svehla et al. 2014). Thus, the system's pH was self-regulated in the process by the high alkalinity of the reject water.

The reactor was repeatedly exposed to temperature drops from 24 to 17 °C. Simultaneously, the NLR was increased incrementally from 0.4 to 1.5 kg/(m³ day). The

Table 1 Temperature, nitrogen loading rate and hydraulic retention time (HRT) at individual periods of reactor operation

Days	Operational period	Temperature [°C]	NLR [kg/(m ³ day)]	HRT [day]
0–16	1	24	0.4	2.8
17–33	2	17	0.4	2.8
34–68	3	24	0.6	2.1
69–109	4	17	0.6	2.1
110–122	5	24	1.0	1.2
123–164	6	17	1.0	1.2
165–213	7	24	1.2	1.0
214–248	8	17	1.2	1.0
249–289	9	24	1.5	0.8
290–330	10	17	1.5	0.8

temperature fluctuation was simulated by changing the temperature on the thermostatic box from original to required levels. Under such conditions, required temperature was achieved after approximately 4 h in the reactor, at the change of particular operational periods. NLR reaching 0.4; 0.6; 1.0; 1.2 and 1.5 kg/(m³ day) was applied during the experiment. NLR was regulated by the control of the raw reject water pumping intensity, where actual TAN concentration in raw reject water was taken into account. The operation of the laboratory model was divided into 10 periods according to the actual value of the NLR and temperature (Table 1). The starting temperature, the intensity of temperature decreases and the range of NLR applied were selected based on the results of the previous experiments (Jenicek et al. 2004; Svehla et al. 2014; Hrnčirova et al. 2017). Duration of particular periods was selected with the aim to ensure sufficient time for the biomass acclimatization after temperature changes where the results of previous experiments (Hrnčirova et al. 2017) were taken into consideration.

Treated water

The reject water from the central wastewater treatment plant in Prague was used. Its quality is shown in Table 2.

Analytical methods

The spectrophotometric measurement of different nitrogen forms (TAN, TN^{III}N, N-NO₃⁻) and chemical oxygen demand (COD) in raw reject water and in the effluent from the reactor was performed using a HACH (Hach Lange GmbH, Germany) DR/4000 photometer according to the standard methods (Eaton et al. 1995). The determination of total suspended solids (TSS) and VSS were measured gravimetrically according to standard methods (Eaton et al.

Table 2 Physico-chemical properties of treated reject water

Parameter	Unit	Average	Range
pH	–	8.4	8.1–8.7
Alkalinity	mmol/L	93	70–121
P total	mg/L	37	23–63
TAN	mg/L	1349	1055–1643
COD	mg/L	2700	1145–4600
COD soluble	mg/L	1532	770–2322
TSS	g/L	3.3	2.1–5.5
Molar ratio alkalinity/TAN	–	1.02	0.76–1.25

TAN total ammonium nitrogen, COD chemical oxygen demand, TSS total suspended solids

1995). P-total concentration was determined with a HACH (Hach Lange GmbH, Germany) DR/4000 photometer using HACH method number 8190. Alkalinity was determined by titration of the sample with hydrochloric acid (0.1 mol/L) up to pH 4.5. Temperature, pH and dissolved oxygen concentration were monitored continuously online using a Gryf Magic XBC device (Gryf HB company, Czech Republic). The value of pH was measured with an ISE electrode PCL 321 XB2 and DO was determined with a membrane electrode KCL 24 XB4. Both types of electrodes were equipped with temperature sensors.

Fluorescence in situ hybridization

As per Daims et al. (2001), FISH was carried out to quantify the amount of AOB and NOB in the sludge from the reactor. The samples of activated sludge were fixed in a 4% paraformaldehyde solution for 3 h at 4 °C. Consequently, they were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) where centrifugation at 3500g for 8 min was applied with the aim to separate the flocs and supernatant (Nielsen et al. 2009). Microorganisms present in the flocs were hybridized by FISH according to Nielsen et al. (2009). AOB were identified using Nso190 and Nso1225 probes and NOB were identified using Ntspa712, Ntspa662 and NIT3 probes. The specificity of all FISH probes applied, probe sequences and fluorophores used for each probes are presented in Table 3.

FISH images were collected using an Olympus BX51-RFAA epifluorescence microscope with a charge-coupled device (CCD) camera. Photos were achieved in 2D at the surface of the floc.

Sludge was sampled on day 232 (period 8), day 253 (period 9) and day 325 (period 10). FISH was carried out at a specialized department (Department of Water

Technology and Environmental Engineering, University of Chemistry and Technology Prague).

Results and discussion

Achievement of partial nitrification during experiment

TN^{III}N represented 94 to 99% of oxidised nitrogen (the sum of TN^{III}N and N–NO₃[–]) in the effluent during the entire reactor operation (Table 4). N–NO₃[–] concentration did not exceed 45 mg/L (Fig. 2). Thus, successful partial nitrification was achieved. This finding is in accordance with Svehla et al. (2014), which proved that the fluctuation of FA and FNA concentration during SBR cycle is able to restrict NOB activity as the sole inhibiting factor where AOB activity could be preserved in nitrifying reactor treating reject water under the conditions applied in our experiment. Contrarily, in a case that a completely stirred tank reactor (CSTR) would be used, the inhibiting effect of FA and/or FNA would be necessary to combine with the other strategy limiting NOB activity, e.g. with controlled oxygen supply, with the aim to achieve partial nitrification (Pacek et al. 2015; Svehla et al. 2014).

Even temperature decreases from 24 to 17 °C realized at the beginning of periods 2, 4, 6, 8 and 10 did not result in a significant increase of N–NO₃[–] production, although faster growth of NOB at temperatures lower than 20 °C was reported by Hellinga et al. (1998) and Hao et al. (2002). The inhibition effect of FA and FNA (Svehla et al. 2014; Anthonisen et al. 1976; Vadivelu et al. 2007; Blackburne et al. 2008; Pambrun et al. 2008) seems to be sufficient to inhibit NOB, despite the temperature reached in the reactor favoured NOB in comparison with AOB (Hellinga et al. 1998; Hao et al. 2002). The washout of NOB during the experiment was proved by the results of Fluorescence In Situ Hybridization (see separate chapter focused on the results of microbial analysis).

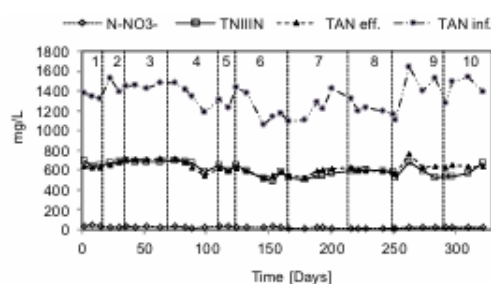
TN^{III}N and TAN concentrations reached 490 to 690 mg/L and 520 to 760 mg/L, respectively, throughout the whole reactor operation (Fig. 2). The average ratios of TN^{III}N and TAN concentrations in the effluent from the reactor ranged between 0.90 and 1.02 within individual periods of the reactor operation where no significant changes of this parameter were registered after the temperature changes (Table 4). Observed TN^{III}N/TAN ratios are in agreement with other studies evaluating partial nitrification of reject water without pH control (van Dongen et al. 2001; Jenicek et al. 2004) being suitable for potential subsequent ANA-MMOX processes.

Table 3 FISH analysis: specificity of all FISH probes, probe sequences, competitor oligonucleotides and fluorophores used for each probe

Probe name	Bacterial genera	Probe sequences	Competitor oligonucleotide	Fluorophores	References
Nso190	Betaproteobacterial ammonia-oxidising bacteria	CGA TCC CCT GCT TTT CTC C	None	Cy3, Fluos	Daims et al. 2006
Nso1225	Betaproteobacterial ammonia-oxidising bacteria	CGC CAT TGT ATT ACG TGT GA	None	Cy3, Fluos	Daims et al. 2006
Ntspa712	Phylum <i>Nitrospirae</i>	CGC CTT CGC CAC CGG CCT TCC	CGC CTT CGC CAC CGG TGT TCC	Cy3, Fluos	Mobarry et al. 1996
Ntspa662	Genus <i>Nitrospira</i>	GGA ATT CCG CGC TCC TCT	GGA ATT CCG CTC TCC TCT	Cy3, Fluos	Mobarry et al. 1996
NIT3	Genus <i>Nitrobacter</i>	CCT GTG CTC CAT GCT CCG	CCT GTG CTC CAG GCT CCG	Cy3, Fluos	Wagner et al. 1996

Table 4 % of $\text{TN}^{\text{III}}\text{N}$ within oxidised nitrogen and $\text{TN}^{\text{III}}\text{N}/\text{TAN}$ ratio

Operational Period	$\text{TN}^{\text{III}}\text{N}/(\text{TN}^{\text{III}}\text{N} + \text{N-NO}_3^-)$ [%]	$\text{TN}^{\text{III}}\text{N}/\text{TAN}$
1	95.5 ± 0.6	1.00 ± 0.02
2	96.8 ± 0.2	1.01 ± 0.02
3	96.2 ± 0.3	1.00 ± 0.01
4	96.8 ± 0.7	1.00 ± 0.04
5	94.9 ± 0.6	1.01 ± 0.03
6	96.4 ± 0.6	0.90 ± 0.06
7	97.0 ± 0.6	0.92 ± 0.04
8	98.2 ± 0.3	1.02 ± 0.02
9	97.5 ± 0.6	0.91 ± 0.05
10	96.9 ± 0.5	0.90 ± 0.06

**Fig. 2** Nitrogen species in the effluent (particular periods indicated using numbers 1–10)

Evaluation of partial nitrification stability according to nitrogen oxidation efficiency and nitrogen oxidation rate

Nitrogen oxidation efficiency (NOE) reached 48 – 58% throughout the whole experiment (Fig. 3). This range of NOE is typical for successful partial nitrification of reject

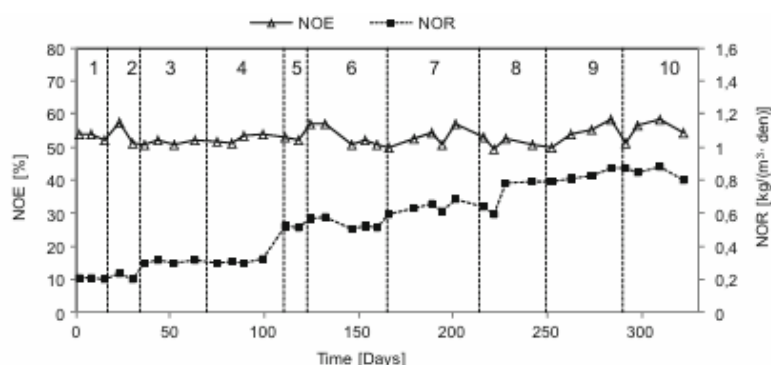
water without pH control (van Dongen et al. 2001; Jenicek et al. 2004). No substantial changes of NOE were registered after temperature falls at the turn of particular periods, indicating good stability of partial nitrification even after temperature decreases from 24 to 17 °C.

Taking into consideration relatively stable NOE during the experiment, the NOR increased proportionally to the NLR within particular periods of the reactor operation (Fig. 3). No apparent decrease in the NOR was registered after the temperature decreases at the beginning of periods 2, 4, 6, 8 and 10 indicating temperature stability of the system within the tested NLR range. During the first phase of the experiment (periods 1 and 2), the NOR reached 0.20 kg/(m³ day) on average. The maximum NOR reaching 0.84 kg/(m³ day) on average was achieved during periods 9 and 10. SHARON process as one of the most commonly applied systems for reject water treatment in a full scale at present time (Lackner et al. 2014) is usually operated at NLR lower than 1 kg/(m³ day) (van Kempen et al. 2001). For subsequent ANAMMOX process ca. 50–60% of TAN should be oxidised to $\text{TN}^{\text{III}}\text{N}$ (van Dongen et al. 2001). The results presented above indicate that our reactor is able to achieve slightly higher NOR comparing with the SHARON reactor integrated into the system SHARON/ANAMMOX, despite the fact that significantly lower temperatures are applied. Additionally, strong fluctuation of temperature did not result in noticeable decreases of NOR.

Evaluation of partial nitrification stability according to pH profile during SBR cycle

H^+ is produced during nitrification process in the phase of nitrite production (Henze et al. 2008). In the case of the nitrification (and partial nitrification as well) of wastewater loaded with high amounts of nitrogen, such as reject water, the pH decreases during the treatment

Fig. 3 NOE and NOR at individual periods of reactor operation (particular periods indicated using numbers 1–10)



process. Insufficient alkalinity for such intensive H^+ production causes this phenomenon (Jenicek et al. 2004; Henze et al. 2008). As a consequence, significant pH fluctuations can be registered during the operational cycle of our SBR system when stable partial nitrification took place within this system (Svehla et al. 2014). Hrnčirova et al. (2017) registered pH value in the range of 6.9–7.9 at the beginning of the SBR cycle working phase during the reject water treatment where the decrease to 4.7–6.5 was monitored at the end of working phase when partial nitrification was satisfactory operated. Consequently, the collapse of the system due to overly radical decrease of temperature was indicated by a pH increase to 8.9 where no pH fluctuation during SBR cycle was observed. Secondly, as a consequence of this pH increase, AOB were greatly inhibited by an extreme increase of FA concentrations reaching up to 150 mg/L.

In the experiment described in this paper, the pH value ranged between 7.6 and 8.2 at the beginning of working phase of the SBR cycle during the entire operation of the reactor (phases 1–10). During the SBR cycle the decrease of pH was observed as 5.2–6.2 measured at the end of the working phase (Fig. 4a). No significant changes in the pH profile were registered during the SBR cycle after sudden temperature decreases from 24 to 17 °C, realized throughout the experiment at different NLRs (at the turn of periods 1 and 2, 3 and 4 (Fig. 4b), 5 and 6, 7 and 8, 9 and 10 (Fig. 4c). Only a slight increase in pH (several tenths of a unit at maximum) was registered as an immediate reaction of the system to the temperature falls (Fig. 4b, c). Nevertheless, the strong fluctuation of pH levels was preserved even at a NLR reaching 1.5 kg/(m³ day) (Fig. 4c). This finding indicates intensive AOB activity and a stable partial nitrification regardless of the changes of NLR and temperature under the conditions applied in this experiment.

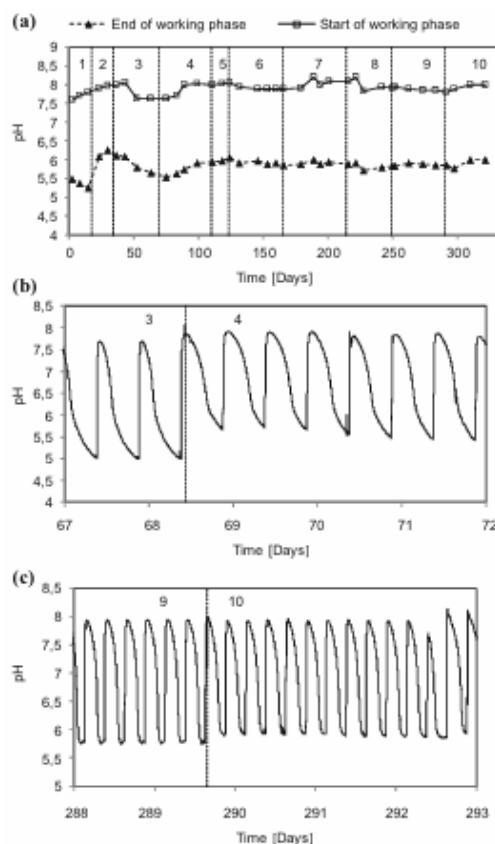


Fig. 4 pH value (particular periods indicated using numbers 1–10). **a** Measured weekly during whole reactor operation. **b** Measured continually at the turn of periods 3 and 4. **c** Measured continually at the turn of periods 9 and 10

Inhibiting pressure of FA and FNA towards AOB and NOB

FA concentration reached maximum levels at the beginning of the working phase of SBR cycle (15 to 74 mg/L, Fig. 5), while FNA concentration increased during the cycle, reaching maximum levels at the end of the working phase (3.5–22 mg/L, Fig. 6). Under such conditions, the inhibition limits of FA (0.1–1.0 mg/L) and FNA (0.2–2.8 mg/L) for non-adapted *Nitrobacter* representing NOB (Anthonisen et al. 1976; Vadivelu et al. 2007) were significantly exceeded. Simultaneously, observed values were significantly higher than the values that enable NOB inhibition, even in long-term basis operated reactors for partial nitrification. In the experiment described by Svehla et al. (2015), FA concentration reaching 7 mg/L at the beginning of the SBR cycle combined with an FNA concentration reaching ca. 1 mg/L at the end of the cycle was proved to be sufficient for effective inhibition of NOB during partial nitrification of diluted reject water in SBR. As a result of the inhibition pressure caused by FA and FNA, the NOB activity was reliably inhibited within the experiment described in this paper.

On the contrary, AOB remained active despite the fact that the inhibition limit for FA reaching 10–150 mg/L (Anthonisen et al. 1976; Mosquera-Corral et al. 2005) was approached (Fig. 5). Even exceeding the FNA inhibition limits 0.1–0.63 mg/L $N-HNO_2$ (Vadivelu et al. 2006) corresponding with 0.3–2.1 mg/L FNA (Fig. 6) did not result in the destruction of partial nitrification. Satisfactory operation of partial nitrification presented in this study seems to be enabled by the ability of AOB to adapt to FA and FNA concentrations significantly higher than the inhibition limits effective for non-adapted cultures (Turk and Mavinic 1989; Villaverde et al. 2000; Zhou et al. 2011). Simultaneously, some observations indicate that different species and strains within a genus of AOB tolerate different levels

of FNA (Zhou et al. 2011). Therefore, certain microbial population shifts leading to a highly tolerant culture cannot be excluded. The ability of AOB to be active at FA and/or FNA concentration strongly exceeding inhibition limits for non-adapted cultures is in accordance with the findings of different authors evaluating partial nitrification process in wastewater loaded with high amounts of nitrogen. Maximum FA and FNA concentrations reached within our experiment are comparable with Svehla et al. (2014) who operated partial nitrification of reject water at the concentrations as high as 38 and 7 mg/L for FA and FNA, respectively. Also Sun et al. (2013) reported satisfactory activity of AOB at FA and FNA concentration exceeding 50 and 2 mg/L, respectively, in a system applying nitrification/denitrification for urban landfill leachate treatment. Wei et al. (2014) achieved satisfactory partial nitrification at FA concentration reaching 86.3 ± 3.29 mg/L. Hrcirova et al. (2017) observed no fatal effect of FNA concentration, even exceeding 60 mg/L within the operation of SBR treating reject water on the partial nitrification principle.

NOE was limited to approximately 50% during the entire reactor operation. This finding indicates that AOB were in some way inhibited at a certain FNA concentration at the end of working phase of SBR cycle in the environment with pH gradually decreasing and FNA concentration gradually increasing during the cycle. Consequently, they were probably reactivated at the beginning of subsequent cycle in connection with the pH increase and simultaneous FNA concentration decrease. This hypothesis is in accordance with Claros et al. (2013) which evaluated the effect of pH and FNA on the activity of AOB in the reactor applying partial nitrification.

Actual concentration of FA is determined by TAN concentration, pH and temperature (Eq. 1). Similarly, FNA concentration is influenced by TN^{NH-N} concentration, pH and temperature according to Eq. 2. (Park and Bae 2009; Anthonisen et al. 1976). The highest FA concentrations

Fig. 5 FA concentrations at the start and at the end of working phase (particular periods indicated using numbers 1–10)

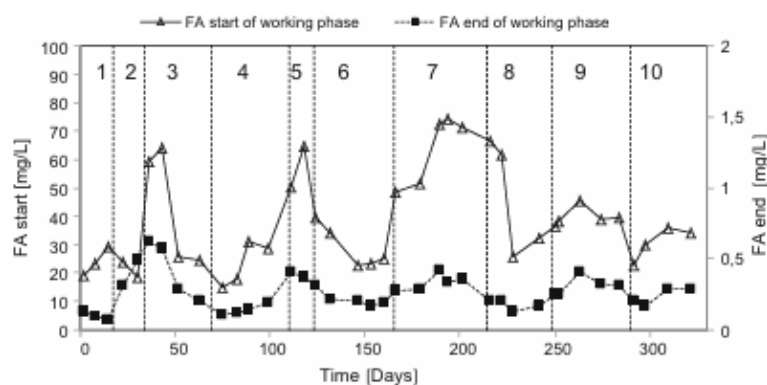
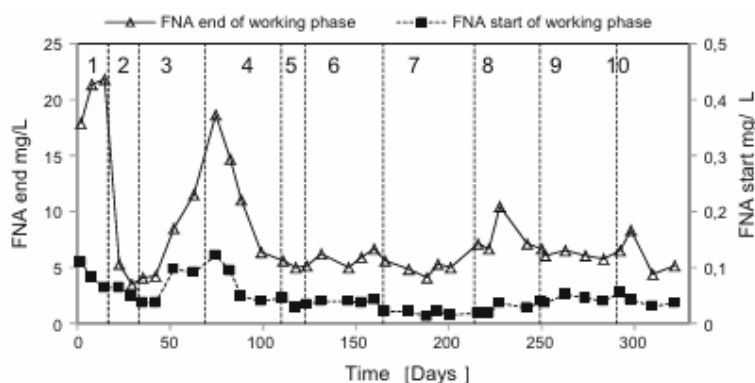


Fig. 6 FNA concentration at the start and at the end of working phase (particular periods indicated using numbers 1–10)



were observed during periods 3, 5, 7 and 8 where the values up to 64, 65, 75 and 66 mg/L, respectively, were reached (Fig. 5). Contrarily, the highest FNA concentrations were achieved during periods 1, 3 and 4 reaching up to 22, 11 and 19 mg/L, respectively (Fig. 6). The pH value seems to be the most important factor determining maximum FA and FNA concentration during SBR cycle (Fig. 4). In contrast, the effect of temperature fluctuation simulated within particular periods seems to be relatively insignificant.

Fluorescence in situ hybridization

Fluorescence in situ hybridization (Fig. 7) showed that AOB prevail over NOB. AOB accounted for 27.2% of the total biomass in period 8, 13.6% in period 9 and 32.1% in period 10. Variable concentrations of organic compounds expressed by COD in treated reject water (see Table 2) probably resulted in variable representation of organotrophic bacteria in sludge and consequently to variable concentrations of total biomass. In agreement with this assumption, TSS concentrations fluctuated significantly during the experiment (2.1–4.5 g/L). This phenomenon seems to be responsible for the observed fluctuation of the representation of AOB in activated sludge.

NOB accounted for 2.0% in period 8; in period 9 and 10 the representation of NOB was lower than the detection limit (0.1%). Very low representation of NOB in activated sludge is in accordance with the accumulation of nitrites observed in the reactor. On the other hand, presence of N-NO_3^- in the effluent from the reactor (even though in very low concentration, Fig. 2) indicates certain activity of NOB in accordance with FISH result of period 8. The occurrence of NOB in our reactor is in accordance with Ganigué et al. (2009) which demonstrated presence of *Nitrobacter* and *Nitrospira* even in the reactor treating leachate with extremely high TAN and $\text{TN}^{\text{III}}\text{N}$

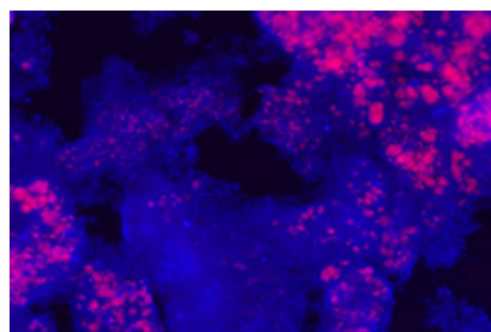


Fig. 7 FISH image of the biomass: pink colour signifies AOB targeting by probes Nso190, Nso1225, NOB were not detected. Enlargement: 320 x, sample taken on day 325 (period 10)

concentrations despite the fact that effective nitrite accumulation was achieved.

Potential implications of results for operation of full-scale reactors applying partial nitrification

Jenicek et al. (2004) proved that SBR treating reject water under conditions analogical to this study could be successfully operated at a NLR of up to 1.65 kg/(m³ day) in the case that the temperature 21 ± 1 °C is applied. Following experiment performed by Hrcirova et al. (2017) proved that the system is able to tolerate sudden temperature falls from 24 to 17 °C, whereas the temperature decreases from 24 to 16 °C led to significant disruption of the treatment process stability at low NLR reaching 0.2 kg/(m³ d). New results presenting within this paper indicate that the system is able to tolerate sudden temperature falls from 24 to 17 °C even when the NLR is approaching maximum values achieved by Jenicek et al. (2004). Thus, the possibility of operating a robust system for the partial

nitritation of reject water or other types of wastewater with extremely high TAN concentration under widely fluctuating temperatures was confirmed. In addition, partial nitritation was operated satisfactorily at NLR 1.5 kg/(m³ d) for 40 day at a constant temperature of 17 °C within operational period 10. This indicates the possibility of operating the tested system at simultaneously low temperatures and high NLR on a long-term basis. Considering the fact that also the possibility of the ANAMMOX process operation at fluctuating temperature significantly lower than the optimum treatment value was proved within some studies (Zekker et al. 2014, 2016), it seems to be possible to operate satisfactory even the system applying partial nitritation/ANAMMOX under unstable temperature conditions.

Combining older results with the findings presented in this paper, it is possible to conclude that the intensity of sudden temperature falls (or more precisely the final value of temperatures reached after the fall from a strictly monitored initial temperature value) influences the stability of the treatment process much more significantly than the NLR. The temperature in very narrow range of 16–17 °C seems to be critical from this point of view under applied conditions.

Maximum NLR applied successfully in this study exceeds values reached in many current full-scale systems for reject water treatment. For example the SHARON process is usually operated at a NLR below 1 kg/(m³ day) and simultaneously at temperature reaching 30–40 °C (van Kempen et al. 2001; Lackner et al. 2014) which significantly exceed temperatures applied in this study. Thus, the system presented within this paper represents a promising variant for the treatment of wastewaters loaded with high amounts of nitrogen. NLRs that were significantly higher than the values achieved within this study were successfully applied by some authors in a laboratory scale. For example, Yang et al. (2010) achieved highly stable performance of partial nitritation with a maximum loading rate reaching 4.2 kg/(m³ day). Even NLR 5.0 ± 1.0 kg/(m³ day) enabled the stable operation of partial nitritation within the experiment described by Torà et al. (2014). Considerably higher operational temperatures (26 and 30 °C, respectively) were applied by Torà et al. (2014) and Yang et al. (2010). In addition, the effect of potential temperature fluctuations was not evaluated within the cited studies.

It is impossible to perfectly simulate the natural ambient temperature fluctuations at a laboratory scale. Sudden decreases in temperature from 24 to 17 °C were applied within this experiment, where the starting temperature was transformed into the required level over approximately 4 h. Such quick changes of temperature seem not be realistic in practice. Taking into

consideration common fluctuations of ambient temperature and the high temperature typical for raw reject water, it is reasonable to expect less intensive fluctuations of temperature in a full-scale reactor. Under such conditions it can be assumed that the system will be able to tolerate even lower temperatures. In accordance with this assumption, Hrnčirova et al. (2017) proved that it is possible to operate partial nitritation of reject water satisfactorily even after gradual temperature falls from 24 to 14.5 °C, in the case that the temperature was decreased incrementally for 12 days at NLR reaching 0.2 kg/(m³ day). Similarly, Persson et al. (2014) confirmed the possibility of successfully applying the partial nitritation/ANAMMOX process to reject water treatment in MBBR after gradual temperature decreases from 19 to 13 °C.

Conclusions

A high-performance system for reject water treatment able to tolerate strong fluctuations of temperature was presented within this study. The stability of partial nitritation operated in a SBR with biomass cultivated in the form of activated sludge was not disrupted even after sudden temperature decrease from 24 to 17 °C realized at a NLR reaching 1.5 kg/(m³ day). Simultaneously, it was found that TN^{III}N was a dominant oxidised nitrogen form regardless of the temperature fluctuation. A strong inhibition effect of FA and FNA was responsible for the restriction of NOB activity under the conditions applied. The authors plan to realize subsequent pilot plant experiments with the aim to simulate better real conditions and to verify the results gained in the laboratory experiments. Simultaneously, the temperature resistance of the systems nitritation/denitritation and partial nitritation/ANAMMOX is planned for the future.

Acknowledgements This work was supported by the the University-wide internal grant agency, CIGA under Grant number 20152013 and by Ministry of Agriculture of the Czech Republic under NAZV project No. QK1710176.

References

- Anthonsen AC, Loehr RC, Prakasam TBS, Srinath EG (1976) Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J WPCF* 5:835–852
- Blackburne R, Yuan Z, Keller J (2008) Demonstration of nitrogen removal via nitrite in a sequencing batch reactor treating domestic wastewater. *Water Res* 8–9:2166–2176. doi:10.1016/j.watres.2007.11.029
- Claros J, Jiménez E, Aguado D, Ferrer J, Seco A, Serralta J (2013) Effect of pH and HNO₂ concentration on the activity of ammonia-oxidizing bacteria in a partial nitritation reactor. *Water Sci Technol* 11:2587–2594. doi:10.2166/wst.2013.132

- Daija L, Selberg A, Rikmann E, Zekker I, Tenno T, Tenno T (2016) The influence of lower temperature, influent fluctuations and long retention time on the performance of an upflow mode laboratory-scale septic tank. *Desalination Water Treat*. doi:10.1080/19443994.2015.1094421
- Daims H, Nielsen JL, Nielsen PH, Schleifer KH, Wagner M (2001) In situ characterization of *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl Environ Microbiol* 11:5273–5284. doi:10.1128/AEM.67.11.5273-5284.2001
- Daims H, Luckner S, Wagner M (2006) Daime, a novel image analysis program for microbial ecology and biofilm research. *Environ Microbiol* 8:200–213. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00880.x
- Eaton AD, Clesceri LS, Greenberg AE, Franson MAH (1995) Standard methods for examination of water and wastewater. APHA, Washington DC, p 826. ISBN:0875532233
- Ganigué R, Gabarró J, Sánchez-Melsió A, Rusalleda M, López H, Vila X, Colprim J, Balaguer MD (2009) Long-term operation of a partial nitrification pilot plant treating leachate with extremely high ammonium concentration prior to an anammox process. *Bioresour Technol* 23:5624–5632. doi:10.1016/j.biortech.2009.06.023
- Ge S, Peng Y, Qiu S, Zhu A, Ren N (2014) Complete nitrogen removal from municipal wastewater via partial nitrification by appropriately alternating anoxic/aerobic conditions in a continuous plug-flow step feed process. *Water Res* 5:95–105. doi:10.1016/j.watres.2014.01.058
- Hao X, Heijnen J, van Loosdrecht MCM (2002) Model-based evaluation of temperature and inflow variations on a partial nitrification-ANAMMOX biofilm process. *Water Res* 19:4839–4849. doi:10.1016/S0043-1354(02)00219-1
- Hellinga C, Schellen AAJC, Mulder JW, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ (1998) The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water. *Water Sci Technol* 9:135–142
- Henze M, van Loosdrecht MCM, Ekama G, Briljanovic D (2008) Biological wastewater treatment: principles, modelling and design. IWA Publishing, London, p 528. ISBN:9781843391883
- Hrncirova H, Svehla P, Radechovsky J, Pacek L, Balik J (2017) The influence of temperature fluctuation on the stability of short-cut nitrification applied for reject water treatment. *Environment Protection Engineering (in press)*
- Hu TY, Lotti T, de Kreuk M, Kleerebezem M, van Loosdrecht M, Kruit J, Jetten MSM, Kartal B (2013) Nitrogen removal by a nitrification-anammox bioreactor at low temperature. *Appl Environ Microbiol* 7:2807–2812. doi:10.1128/AEM.03987-12
- Jenicek P, Svehla P, Zabranska J, Dohanyos M (2004) Factors affecting nitrogen removal by nitrification/denitrification. *Water Sci Technol* 5–6:73–79
- Kim JH, Guo X, Park HS (2008) Comparison study of the effects of temperature and free ammonia concentration on nitrification and nitrite accumulation. *Process Biochem* 2:154–160. doi:10.1016/j.procbio.2007.11.005
- Kouba V, Catrysse M, Stryjova H, Jonatova I, Volcke E, Svehla P, Bartacek J (2014) The impact of influent total ammonium nitrogen concentration on nitrite oxidizing bacteria inhibition in moving bed biofilm reactor. *Water Sci Technol* 6:1227–1233. doi:10.2166/wst.2013.757
- Lackner S, Gilbert EM, Vlaeminck SE, Joss A, Horn H, van Loosdrecht MCM (2014) Full-scale partial nitrification/anammox experiences—an application survey. *Water Res* 55:292–303. doi:10.1016/j.watres.2014.02.032
- Mobarry BK, Wagner M, Urbain V, Rittmann BE, Stahl DA (1996) Phylogenetic probes for analysing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl Environ Microbiol* 6:2156–2162
- Mosquera-Corral A, Gonzales F, Campos JL, Mendez R (2005) Partial nitrification in a SHARON reactor in the presence of salts and organic carbon compounds. *Process Biochem* 9:3109–3118. doi:10.1016/j.procbio.2005.03.042
- Mulder A, van de Graaf AA, Robertson LA, Kuenen JG (1995) Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol Ecol* 3:177–183
- Nielsen, P. H., Daims, H. & Lemmer, H. (2009). FISH handbook for biological wastewater treatment. London
- Pacek L, Svehla P, Bartacek J, Radechovsky J, Hrncirova H, Shejbalova S, Balik J, Jenicek P (2015) Direct and indirect effects of oxygen limitation on nitrification process applied to reject water treatment. *Desalination Water Treat* 3:598–607. doi:10.1080/19443994.2014.950336
- Pambrun V, Paul L, Spérandio M (2008) Control and modelling of partial nitrification of effluents with high ammonia concentrations in sequencing batch reactor. *Chem Eng Process* 3:323–329. doi:10.1016/j.ccep.2007.01.028
- Park S, Bae W (2009) Modelling kinetics of ammonium oxidation and nitrite oxidation under simultaneous inhibition by free ammonia and free nitrous acid. *Process Biochem* 6:631–640. doi:10.1016/j.procbio.2009.02.002
- Persson F, Sultana R, Suarez M, Hermansson M, Plaza E, Wilén BM (2014) Structure and composition of biofilm communities in a moving bed biofilm reactor for nitrification-anammox at low temperatures. *Bioresour Technol* 2:267–273. doi:10.1016/j.biortech.2013.12.062
- Rodríguez DC, Pino N, Peñuela G (2011) Monitoring the removal of nitrogen by applying a nitrification-denitrification process in a sequencing batch reactor (SBR). *Bioresour Technol* 3:2316–2321. doi:10.1016/j.biortech.2010.10.082
- Ruiz G, Jeison D, Chamy R (2003) Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration. *Water Res* 6:1371–1377. doi:10.1016/S0043-1354(02)00475-X
- Sun HW, Bai Y, Peng YZ, Xie HG, Shi XN (2013) Achieving nitrogen removal via nitrite pathway from urban landfill leachate using the synergetic inhibition of free ammonia and free nitrous acid on nitrifying bacteria activity. *Water Sci Technol* 9:2035–2041. doi:10.2166/wst.2013.432
- Svehla P, Bartacek J, Pacek L, Hrncirova H, Radechovsky J, Hanc A, Jenicek P (2014) Inhibition effect of free ammonia and free nitrous acid on nitrite-oxidizing bacteria during sludge liquor treatment: influence of feeding strategy. *Chem Pap* 7:871–878. doi:10.2478/s11696-014-0538-6
- Svehla P, Radechovsky J, Hrncirova H, Pacek L, Bartacek J (2015) Effect of influent nitrogen concentration on feasibility of short-cut nitrification during wastewater treatment in activated sludge systems. *Chem Pap* 7:921–929. doi:10.1515/chempap-2015-0095
- Torà JA, Lafuente J, Garcia-Belinchón C, Bouchy L, Carrera J, Baeza JA (2014) High-throughput nitrification of reject water with a novel ammonium control loop: stable effluent generation for anammox or heterotrophic denitrification. *Chem Eng J* 24:265–271. doi:10.1016/j.cej.2013.11.056
- Turk O, Mavinic DS (1989) Stability of nitrite build-up in an activated sludge system. *J WPCF* 8:1440–1448
- Vadivelu VM, Keller J, Yuan ZG (2006) Effect of free ammonia and free nitrous acid concentration on the anabolic and catabolic processes of an enriched *Nitrosomonas* culture. *Biotechnol Bioeng* 9:830–839. doi:10.1002/bit.21018
- Vadivelu VM, Keller J, Yuan Z (2007) Effect of free ammonia on respiration and growth process of an enriched *Nitrobacter* culture. *Water Res* 4:826–834. doi:10.1016/j.watres.2006.11.030
- van Dongen U, Jetten MSM, van Loosdrecht MCM (2001) The SHARON-Anammox process for treatment of ammonium rich wastewater. *Water Sci Technol* 12:153–160

- van Kempen R, Mulder JW, Uijterlinde CA, Loosdrecht MCM (2001) Overview: full scale experience of the SHARON process for treatment of rejection water of digested sludge dewatering. *Water Sci Technol* 1:145–152
- Villaverde S, Fdz-Polanco F, Garcia PA (2000) Nitrifying biofilms acclimation to free ammonia in submerged biofilters, start-up influence. *Water Res* 2:602–610. doi:10.1016/S0043-1354(99)00175-X
- Volcke EIP, Loccufer M, Vanrolleghem PA, Noldus EIJL (2006) Existence, uniqueness and stability of the equilibrium points of a SHARON bioreactor model. *J Process Control* 10:1003–1012. doi:10.1016/j.jprocont.2006.08.004
- Wagner M, Rath MG, Koops HP, Flood J, Amann R (1996) In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Water Sci Technol* 1–2:237–244
- Wei D, Xue X, Yan L, Sun M, Zhang G, Shi L, Du B (2014) Effect of influent ammonium concentration on the shift of full nitrification to partial nitrification in a sequencing batch reactor at ambient temperature. *Chem Eng J* 1:19–26. doi:10.1016/j.cej.2013.09.005
- Yang J, Zhang L, Daisuke H, Takahiro S, Ma Y, Li Z, Furukawa K (2010) High rate partial nitrification treatment of reject wastewater. *J Biosci Bioeng* 4:436–440. doi:10.1016/j.jbiosc.2010.05.003
- Zekker I, Rikmann E, Tenno T, Saluste A, Tomingas M, Menert A, Loorits L, Lemmikso V, Tenno T (2012) Achieving nitrification and anammox enrichment in single moving-bed biofilm reactor treating reject water. *Environ Technol* 4–6:703–710. doi:10.1080/09593330.2011.588962
- Zekker I, Rikmann E, Tenno T et al (2014) Start-up of low temperature anammox in UASB from mesophilic yeast factory anaerobic tank inoculum. *Environ Technol* 36:214–225. doi:10.1080/09593330.2014.941946
- Zekker I, Rikmann E, Mandel A et al (2016) Step—wise temperature decreasing cultivates a biofilm with high nitrogen removal rates at 9 °C in short- term anammox biofilm tests. *Environ Technol* 15:1933–1946. doi:10.1080/09593330.2015.1135995
- Zhou Y, Oehmen A, Lim M, Vadivelu V, Ng WJ (2011) The role of nitrite and free nitrous acid (FNA) in wastewater treatment plants. *Water Res* 10:4672–4682. doi:10.1016/j.watres.2011.06.025

4 Sumární diskuze

Experimenty prezentované v rámci této práce probíhaly ve dvou laboratorních modelech simulujících biologické čištění odpadní vody. Ideově vycházely především z předcházejícího výzkumu na VŠCHT v Praze (Švehla 2004) a poznatků získaných během dlouhodobého výzkumu na toto téma realizovaného na KAVR ČZU v Praze (např. Pacek 2014; Švehla et al. 2014). Laboratorní model č. 1 (články 1 a 2 – viz kapitola Publikované práce) a laboratorní model č. 2 (články 3 a 4) pracovaly v režimu SBR. Jako vstupní voda byla při všech experimentech použita kalová voda vznikající při odvodňování anaerobně stabilizovaného kalu na Ústřední čistírně odpadních vod v Praze, která obsahovala N-amon v koncentračním rozmezí 1000 – 1700 mg/l.

V laboratorním modelu č. 1 byla při teplotě 15 °C postupně měněna vstupní koncentrace N-amon v čištěné vodě (kalová voda použitá v rámci experimentu byla na požadovanou vstupní koncentraci N-amon ředěna vodou vodovodní) s cílem posoudit aplikovatelnost zkrácené nitrifikace na odpadní vody s různým obsahem N-amon a citlivost jednotlivých skupin nitrifikačních organismů na FA a FNA v daných podmínkách. Pro lepší orientaci v následujícím textu je v tabulce 1 uveden harmonogram změn vstupní koncentrace N-amon. Koncentrace rozpuštěného kyslíku v reaktoru nebyla limitována a po celou dobu experimentu přesahovala 5 mg/l. Objemové zatížení amoniakálním dusíkem bylo po celou dobu experimentů udržováno na stabilní hodnotě okolo 0,2 kg/(m³·d).

Tabulka 1. Harmonogram provozu laboratorního modelu č. 1

Etapa	Dny provozu	N-amon vstup (mg/l)	Počet cyklů za den	Doba zdržení (h)
1	1- 158	600	2	72
2	159 - 258	300	2	36
3	259 - 320	150	2	18
4	321 - 447	75	4	9
5	448 - 461	150	4	18
	462 - 469	300	2	34

	470 - 487	600	2	68
	488 - 506	1000	2	120

V laboratorním modelu č. 2 byla v první fázi experimentu měněna teplota použité kalové vody (harmonogram změn viz tabulka 2) a byl sledován vliv výkyvů teploty na průběh odstraňování amoniakálního dusíku. Objemové zatížení reaktoru amoniakálním dusíkem se pohybovalo okolo 0,2 kg/(m³·d).

Tabulka 2. Harmonogram změn nastavené teploty v laboratorním modelu č. 2

Etapa	Dny provozu	Nastavená teplota (°C)	Skutečná teplota – průměr (°C)
1	0 – 13	25	24,3
2	14 – 46	15	14,3
3	47 – 171	25	24,3
4	172 – 192	18	17,4
5	193 – 228	25	24,3
6	229 – 276	16,5	15,8
7	277 – 360	25	24,3
8	361	23	22,4
	362	21	20,3
	363	19	18,4
	364 – 371	17	16,3
	372 – 375	15	14,4
	376 – 392	13	12,7

V druhé fázi experimentu, která vycházela z poznatků té předcházející, byla teplota opakovaně snižována z 24 °C na 17 °C a byla posuzována stabilita procesu při postupně se zvyšujícím objemovém zatížení reaktoru amoniakálním dusíkem (viz tabulka 3). V první i ve druhé fázi experimentu nebyla koncentrace rozpuštěného kyslíku v reaktoru limitována, po celou dobu experimentu se pohybovala nad 3 mg/l.

Tabulka 3. Harmonogram druhé fáze experimentu

Etapa	Dny provozu	Nastavená teplota (°C)	Objemové zatížení N-amon [kg/(m ³ ·d)]	Doba zdržení (dny)
1	0 – 16	24	0,4	2,8
2	17 – 33	17	0,4	2,8
3	34 – 68	24	0,6	2,1
4	69 – 109	17	0,6	2,1
5	110 – 122	24	1,0	1,2
6	123 – 164	17	1,0	1,2
7	165 – 213	24	1,2	1,0
8	214 – 248	17	1,2	1,0
9	249 – 289	24	1,5	0,8
10	290 – 330	17	1,5	0,8

Nejdůležitější výsledky z průběhu celého výzkumu budou diskutovány v následujících kapitolách.

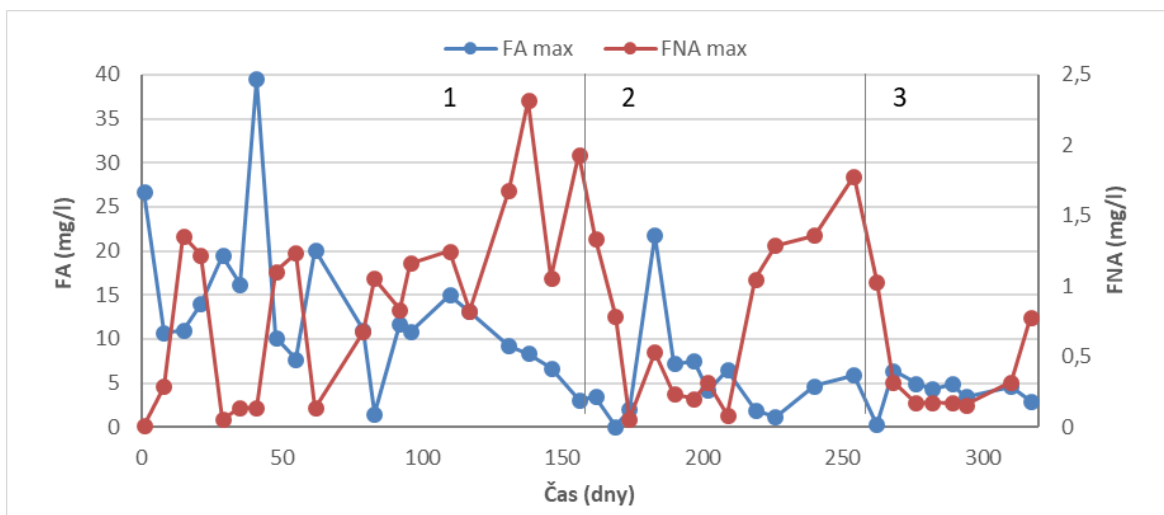
4. 1 Zkrácená nitrifikace při nízké teplotě a proměnlivé vstupní koncentraci N-amon

V rámci předcházejícího výzkumu (Pacek 2014; Švehla et al. 2014) bylo zjištěno, že výkyvy FA a FNA, ke kterým dochází během provozu reaktoru v režimu SBR, jsou jednou ze spolehlivých strategií, jak potlačit činnost NOB při nitrifikaci kalové vody, respektive jak docílit dlouhodobé stabilní zkrácené nitrifikace při zpracování této vody. Cílem experimentu probíhajícího v laboratorním modelu č. 1 tak bylo určit vstupní koncentraci N-amon, při níž bude tato strategie ještě úspěšná. Zároveň bylo záměrem rozšířit okruh teplot, při níž je tento postup udržitelný, aby bylo možné jej využít i při zpracování „studenějších“ odpadních vod podobného charakteru (např. skládkového výluhu).

Obecně lze říci, že vyšší teploty zvýhodňují AOB oproti NOB (Hellingsa et al. 1998; Kim et al. 2008). Za vyšších teplot je rozdílná rychlost růstu AOB a NOB, např. Rodriguez-Sanchez et al. (2014) uvádí, že při teplotě nad 24 °C je rychlost růstu NOB nižší než AOB, ale při teplotě nižší než 15 °C rostou rychleji NOB a stávají se dominantními v mikrobiální kultuře. V rozmezí teplot 15 – 24 °C rostou AOB i NOB přibližně srovnatelnou rychlostí. Dá se tedy předpokládat, že při teplotě 15 °C a nižší budou zvýhodněny NOB vůči AOB a dosažení dlouhodobé a stabilní zkrácené nitrifikace bude obtížnější.

V laboratorním modelu č. 1 bylo dosaženo zkrácené nitrifikace při teplotě 15 °C v odpadní vodě s koncentrací N-amon 600, 300 a 150 mg/l (etapa 1 – 3), ačkoli teplota se spíše blížila hodnotám podporujícím rychlejší růst NOB ve srovnání s AOB (Hellingsa et al. 1998; Kim et al. 2008; Reino & Carrera 2021). V etapě 3 se rovněž vstupní koncentrace N-amon přiblížila hodnotám (desítky mg/l), které obecně nejsou pro dosažení zkrácené nitrifikace výhodné, jak uvádí např. Wu et al. (2021) nebo Wang et al. (2022). Inhibiční vliv FA a FNA podpořený provozem modelu v režimu SBR byl tedy i v těchto podmínkách zřejmě dostačující pro dosažení zkrácené nitrifikace.

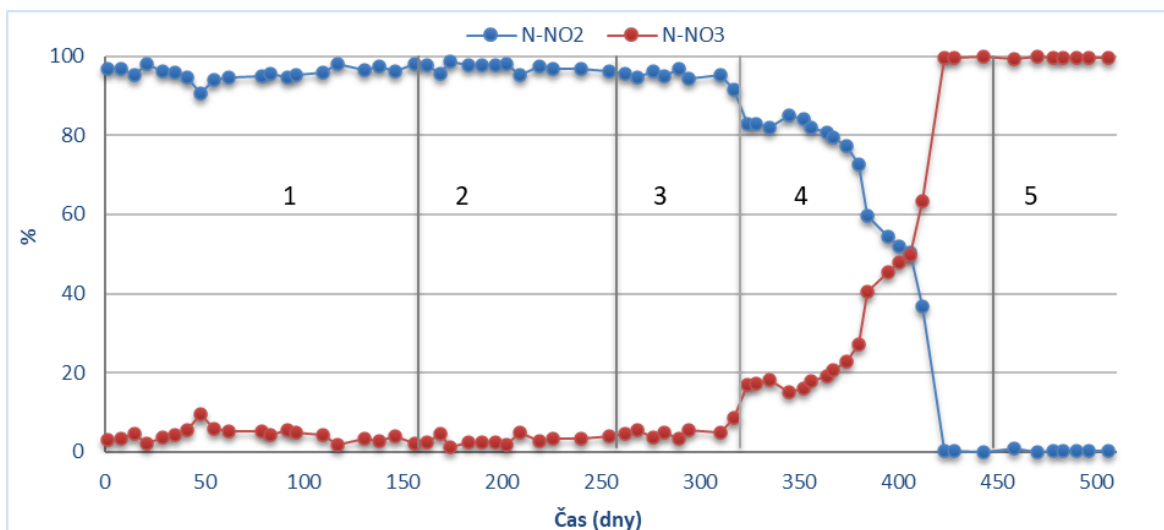
Na obr. 1 jsou uvedeny maximální koncentrace FA a FNA zaznamenané během etap 1 – 3 v laboratorním modelu č. 1, přičemž maximální koncentrace FA byly dosaženy na začátku cyklu SBR po nadávkování odpadní vody (její hodnota pH se pohybovala v rozmezí 7,8 – 8,4) do reaktoru a zvýšení pH, maximální koncentrace FNA na konci cyklu po snížení pH v důsledku proběhlé nitrifikace a zvýšení koncentrace N-NO₂⁻ v reaktoru vyvolaného aktivitou AOB (Pitter 2009).



Obr. 1 – Maximální koncentrace FA a FNA zaznamenané v laboratorním modelu č. 1 během etap experimentu 1 - 3

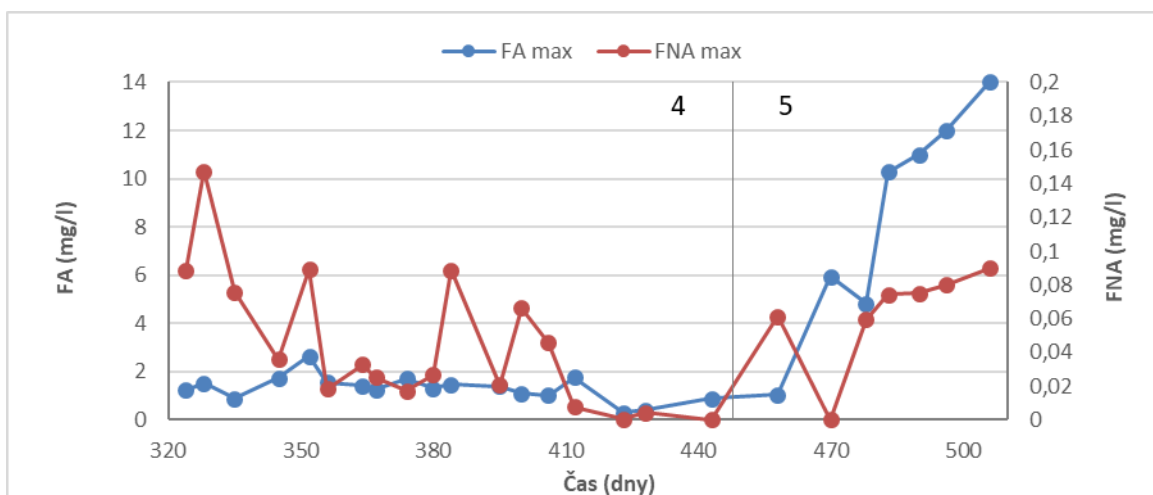
Anthonisen et al. (1976) uvádí, že inhibice NOB za současného zachování funkce AOB začíná při koncentraci FA v rozmezí 0,1 - 1 mg/l a koncentraci FNA v rozmezí 0,22 – 2,8 mg/l. Je patrné, že většina hodnot maximálních koncentrací FA zejména v etapách 2 a 3 leží v koncentračním rozmezí dle Anthonisena et al. (1976), v němž by mělo docházet k inhibici NOB. Většina zaznamenaných koncentrací FNA se v etapách 1 – 3 pohybuje v koncentračním rozmezí 0,22 – 2,8 mg/l, při níž by dle Anthonisena et al. (1976) měla začínat inhibice NOB. Leží také nad hranicí 0,026 – 0,22 mg/l, která by měla aktivitu NOB inhibovat dle Zhoua et al. (2011). Zastoupení N-NO_2^- mezi oxidovanými formami dusíku v odtoku z reaktoru bylo dominantní (viz obr. 2) a účinnost odstranění N-amon se stabilně pohybovala v rozmezí 48 – 52 %, což svědčí o dosažení stabilní zkrácené nitrifikace. Účinnost pohybující se okolo 50 % byla dána pufrací kapacitou použité kalové vody, v průběhu čistícího procesu totiž pH klesá na hodnotu inhibující další nitrifikační aktivitu (Khin & Annachhatre 2004). Navýšit účinnost odstranění N-amon by bylo možné např. dávkováním alkalického činidla (Torá et al. 2014). Koncentrace N-NO_2^- se v etapě 1 pohybovaly v rozmezí 250 – 350 mg/l, v etapě 2 v rozmezí 150 – 200 mg/l, v etapě 3 v rozmezí 70 – 100 mg/l. Koncentrace N-NO_3^- se v etapě 1 pohybovaly v rozmezí 10 – 15 mg/l, v etapě 2 se pohybovaly okolo 10 mg/l a v etapě 3 okolo 5 mg/l.

Z toho lze vyvodit závěr, že aktivita NOB byla v důsledku společného inhibičního působení FA a FNA potlačena. Svoji roli při potlačení činnosti NOB mohl sehrát i disociovaný N-NO_2^- , protože v etapě 1 byl překročen limit 198 mg/l uváděný Budayem et al. (1999) jako dostačující pro 50 % inhibici aktivity NOB. Hodnoty blíží se této hranici byly naměřeny také v etapě 2.



Obr. 2 – Zastoupení N-NO_3^- a N-NO_2^- mezi oxidovanými formami dusíku v odtoku z laboratorního modelu č. 1

Maximální hodnoty koncentrací FA a FNA zaznamenané v laboratorním modelu č. 1 během etap 4 a 5 jsou zdokumentovány na obr. 3.



Obr. 3. – Maximální hodnoty koncentrací FA a FNA zaznamenané v laboratorním modelu č. 1 během etap experimentu 4 a 5

Maximální koncentrace FA se v etapách 2, 3 a 4 (vstupní koncentrace N-amon 75 mg/l) postupně snížila až na hodnoty, které by dle Anthonisena et. al. (1976) neměly potlačovat činnost AOB (v etapě 2 a 3 až na jednu výjimku koncentrace do 10 mg/l, v etapě 4 do 3 mg/l), ale které by dle této práce měly být dostačující pro inhibici NOB. Přesto byla aktivita NOB během etapy 4 postupně obnovena, o čemž svědčí také nárůst koncentrace N-NO₃⁻ v odtoku (z cca 5 mg/l na cca 40 mg/l). K podobným závěrům dospěli také Kouba et al. (2014) v analogickém experimentu (15 °C, objemové zatížení reaktoru N-amon 0,2 kg/(m³·d), vstupní koncentrace N-amon 600 – 75 mg/l) s použitím biomasy kultivované ve formě biofilmu. Možné vysvětlení tohoto jevu zřejmě spočívá v dosažených koncentracích FNA. Na začátku etapy 4 byla zaznamenána na konci cyklu SBR hodnota až 0,15 mg/l, která postupně klesala (zejména v důsledku poklesu koncentrace N-NO₂⁻ z cca 50 mg/l na hodnoty nepřevyšující 5 mg/l) a v celé etapě 4 tak byly zaznamenány hodnoty, které leží pod hranicí zmiňovanou Anthonisem et al. (1976), kdy by mělo docházet k inhibici NOB. A pohybovala se rovněž pod hranicí potřebnou pro inhibici NOB zmiňovanou Zhouem et al. (2011). Zdá se tedy, že pro potlačení činnosti NOB je v daných podmínkách inhibiční účinek FNA zásadnější než inhibiční účinek FA, což rovněž zmiňují např. Ren et al. (2021) nebo Liu et al. (2023). Důležité může v daných podmínkách být také společné působení FNA s FA a kolísání jejich koncentrací během cyklu SBR (Švehla et al. 2014). V etapě 5 se koncentrace FA v reaktoru zvýšila až na hodnoty, kdy by dle Anthonisena et al. (1976) mělo docházet k inhibici NOB i AOB, koncentrace FNA se zvedla na hodnoty, kdy by dle Zhoua et al. (2011) mělo docházet k inhibici NOB, nicméně proces zkrácené nitrifikace se nepodařilo obnovit, což bylo patrně dáno adaptací NOB na vysoké koncentrace FA i FNA (viz kapitola 4. 4. 2).

4. 2 Zkrácená nitrifikace při různě intenzivních teplotních výkyvech

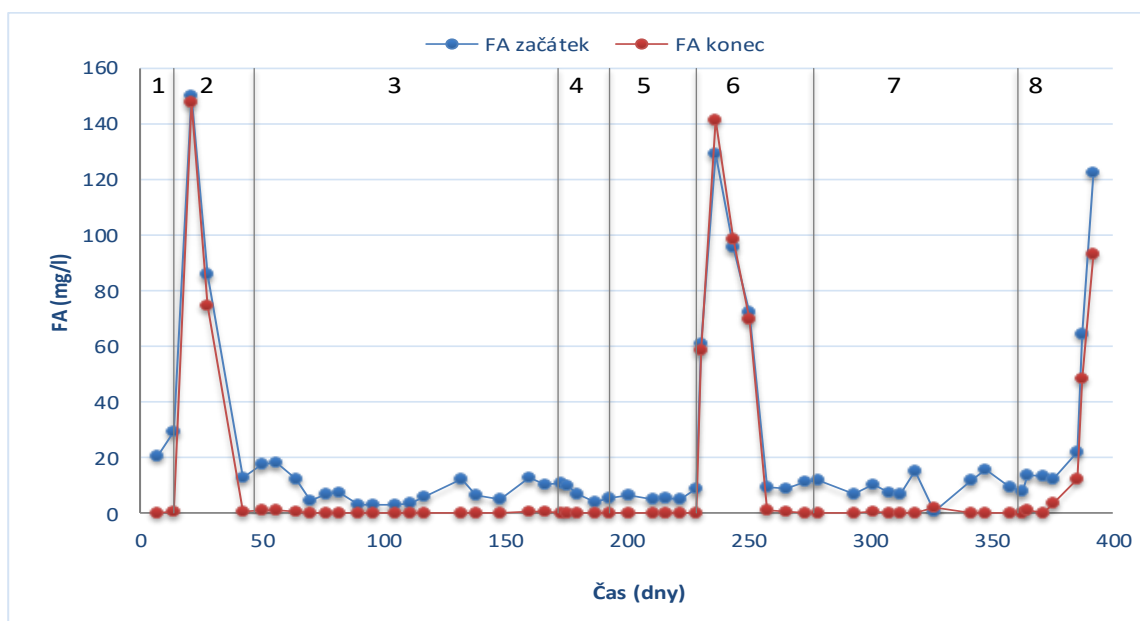
Jak již bylo zmíněno, jedním z problémů limitujících aplikovatelnost zkrácené nitrifikace při čištění odpadních vod je značná citlivost AOB na teplotu prostředí (Rodríguez et al. 2011). Pro kalovou vodu využitou během výzkumu v rámci této práce je typická vysoká teplota a Švehla et al. (2014) prokázali, že je při jejím zpracování možné dosáhnout stabilní zkrácené nitrifikace v režimu SBR při teplotě 23 ± 2 °C. Nicméně toto

rozmezí může být obtížné udržet zejména v zimním období a je nutné brát v úvahu vliv možných teplotních výkyvů na průběh procesu.

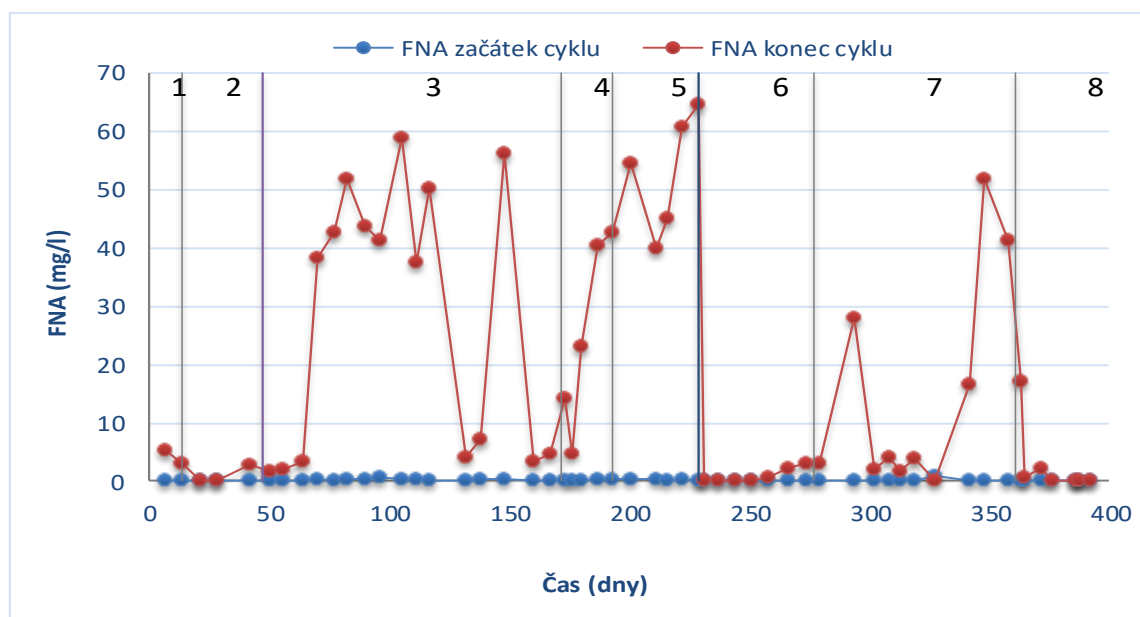
U laboratorního modelu č. 2 bylo dosaženo stabilní zkrácené nitrifikace po náhlém poklesu teploty z 24,3 °C na 17, 4 °C (etapa 4). Po poklesech teploty na 14,3 (etapa 2) a 15,8 °C (etapa 6) bylo pozorováno výrazné ovlivnění procesu. Hodnoty pH na začátku a na konci cyklu SBR se v etapách 2 a 6 sjednotily na hodnotách okolo 8,9. Během nitrifikace ve fázi oxidace N-amon na N-NO₂⁻ dochází k uvolňování iontů H⁺, které snižují hodnotu pH (Henze et al. 2008), takže pokud je v SBR dosaženo stabilní zkrácené nitrifikace, vlivem aktivity AOB lze pozorovat při zpracování kalové vody, resp. vody podobných vlastností, významné rozdíly mezi hodnotami pH na začátku a na konci cyklu. Pokud dojde ke snížení funkce AOB, rozdíl mezi hodnotami pH na začátku a na konci cyklu se zmenšuje (Švehla et al. 2014). V dalším průběhu etap 2 a 6 se ovšem průběh zkrácené nitrifikace opět stabilizoval, takže hodnoty pH na začátku a na konci cyklu se začaly opět odlišovat. Podobný trend vykazovaly také koncentrace N-NO₂⁻. Koncentrace N-NO₂⁻ poklesla na začátku etapy 2 z 650 mg/l (konec 1. etapy) na 360 mg/l a v etapě 6 ze 400 mg/l (konec 5. etapy) na 230 mg/l. Na konci etap 2 a 6 se ale koncentrace N-NO₂⁻ v odtoku z reaktoru opět zvýšila na 650 mg/l v etapě 2 a na 490 mg/l v etapě 6. Při pozvolném snižování teploty z 24,3 °C (etapa 8) došlo k výraznému ovlivnění stability procesu až při teplotě 12,7 °C, kdy bylo opět pozorováno sjednocení hodnoty pH na začátku a na konci cyklu SBR okolo 8,9 a koncentrace N-NO₂⁻ klesla z 520 mg/l na 380 mg/l.

Hodnoty FA a FNA zaznamenané během experimentu jsou na obr. 4 a 5. V etapách 1, 3, 4, 5 a 7 se koncentrace FA na začátku cyklu pohybovala v rozmezí 3 – 20 mg/l a koncentrace FNA na konci cyklu dosáhla až 61 mg/l (etapa 5). V etapách, kdy bylo dosaženo stabilní zkrácené nitrifikace, byla aktivita NOB potlačena v důsledku společného inhibičního působení FA a FNA, zatímco aktivita AOB byla v těchto podmínkách zachována i při extrémně vysoké koncentraci FNA (viz kapitola 4. 4. 1). Na začátku etap 2 a 6 i na konci etapy 8 byla aktivita AOB zřejmě primárně potlačena poklesem teploty. To v důsledku poklesu intenzity tvorby H⁺ při činnosti AOB (viz výše) vyvolalo nárůst pH po celou dobu cyklu, a proto došlo sekundárně k extrémnímu nárůstu koncentrace FA, která

se tak dostala do rozmezí uváděného Anthonisem et al. (1976) v souvislosti s inhibicí AOB.



Obr. 4. - Koncentrace FA na začátku a na konci cyklu SBR během 1. fáze experimentu v laboratorním modelu č. 2



Obr. 5 – Koncentrace FNA na začátku a na konci cyklu SBR během 1. fáze experimentu v laboratorním modelu č. 2

4. 3 Zkrácená nitrifikace při teplotních výkyvech a měnícím se zatížení reaktoru N-amon

Druhá fáze experimentu v laboratorním modelu č. 2 navazovala na poznatky získané při první fázi pokusu a jejím smyslem bylo vyhodnotit, zda bude aktivita AOB zachována v dostatečné míře pro udržení stabilní zkrácené nitrifikace po náhlých teplotních změnách (z 24 na 17 °C) i při zvyšujícím se zatížení reaktoru N-amon.

Bylo zjištěno, že sledovaný systém byl stabilní, i když se teplota náhle snižovala z 24 °C na 17 °C při postupně se zvyšujícím zatížení 0,4 do 1,5 kg/(m³·d). Např. Jeníček et al. (2004) dosáhli v režimu SBR za podobných podmínek zkrácené nitrifikace i při nepatrně vyšším zatížení amoniakálním dusíkem, které bylo 1,65 kg/(m³·d), nicméně experiment probíhal za teploty 21 ± 1 °C a nehodnotil vliv teplotních výkyvů. Podobně je tomu i u ostatních studií. Např. Torá et al. (2014) dosáhli zkrácené nitrifikace při zatížení reaktoru N-amon dokonce 5,0 ± 1,0 kg/(m³·d), ale při teplotě 26 °C a s využitím speciálního řídicího systému s regulací hodnoty pH, koncentrací rozpuštěného kyslíku a hydraulické doby zdržení. Vliv teplotních výkyvů navíc opět nebyl hodnocen. Zdá se tedy, že výsledek experimentu, který byl proveden v rámci této práce, by mohl přispět k optimalizaci systémů pro čištění odpadní vody s vysokou koncentrací N-amon, které většinou pracují za vyšších teplot jako např. systém SHARON (Lackner et al. 2014).

4. 4 Adaptace nitrifikačních organismů na vysoké koncentrace FA a FNA

V předcházejícím textu byla uvedena rozmezí koncentrací FA a FNA dle Anthonisena et al. (1976) a Zhoua et al. (2011), v nichž by mělo docházet k inhibici AOB a NOB. Řada autorů ovšem zaznamenala aktivitu AOB nebo NOB i při hodnotách, které do uvedených rozmezí nespádají (viz kapitola 1. 4. 5.). Podobná pozorování byla zaznamenána i během experimentů v rámci této práce.

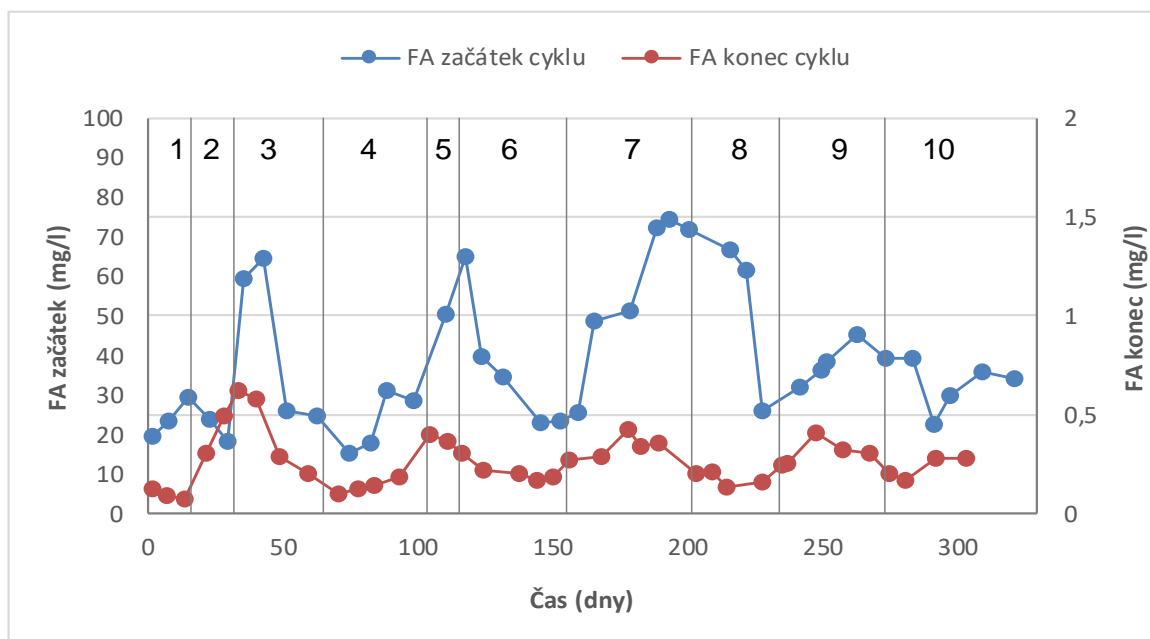
4. 4. 1 Adaptace AOB

V laboratorním modelu č. 1 bylo především během etapy 1 (cca prvních 110 dní) dosaženo koncentrací FA, které by měly potlačovat činnost AOB, protože inhibice AOB začíná dle Anthonisena et al. (1976) při koncentraci FA v rozmezí 10 – 150 mg/l. Dále

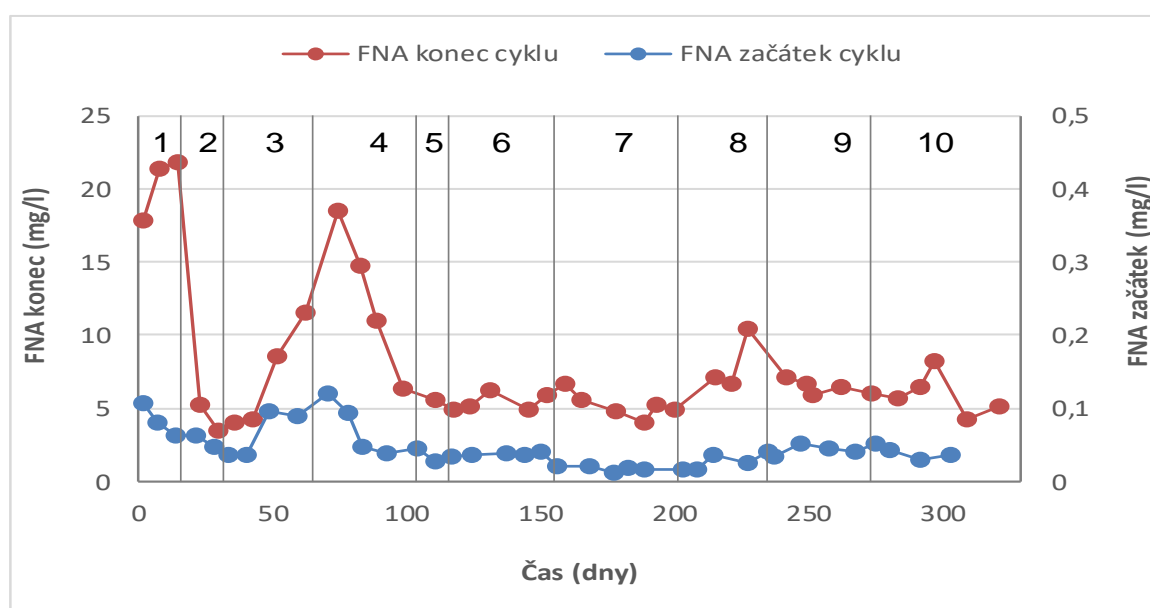
byly během etap 1 - 3 zaznamenány také maximální koncentrace FNA v rozmezí 0,42 – 1,72 mg/l, v němž Zhou et al. (2011) uvádí, že dochází ke snížení aktivity AOB o 50 %. Přesto během etap 1 - 3 nedošlo k výrazné změně v zastoupení N-NO_3^- a N-NO_2^- mezi oxidovanými formami dusíku v odtoku z reaktoru (viz obr. 2) a nebylo zaznamenáno výrazné snížení účinnosti odstranění N-amon. AOB byly zřejmě schopny adaptace na vysoké hodnoty FA i FNA.

Podobný fenomén byl pozorován i při provozu laboratorního modelu č. 2 v první fázi experimentu. V době stabilní zkrácené nitrifikace při teplotě 24,3 °C (etapa 3, 5 a 7) se AOB dokázaly vypořádat i s koncentracemi FNA až 61 mg/l (viz obrázek 5), které byly zaznamenány v závěru etapy 5, ačkoli Zhou et al. (2011) uvádí, že již koncentrace v rozmezí 0,42–1,72 mg/l snižují aktivitu AOB o 50 % a Vadivelu et al. (2006) uvádí inhibici AOB při koncentraci FNA v rozmezí 0,1 – 0,63 mg/l. To bylo zřejmě dáno provozem v systému SBR, kdy byly AOB patrně po začátku nového cyklu reaktivovány díky zvýšení hodnoty pH a s ní souvisejícím poklesem koncentrace FNA v reaktoru, což zmiňují rovněž Claros et al. (2013). Jak již bylo uvedeno v kapitole 4. 2, v etapách 2 (snížení teploty na 14,3 °C) a 6 (snížení teploty na 15,8 °C) byly zaznamenány koncentrace FA až 150 mg/l, které by dle Anthonisena et al. (1976) měly aktivitu AOB inhibovat. Přestože došlo za těchto podmínek k narušení stability procesu (viz kapitola 4. 2), AOB byly schopny svou aktivitu po určité době opět obnovit (v etapě 2 cca po 15 dnech, v etapě 6 po cca 20 dnech) a s poklesem hodnoty pH klesly následně i koncentrace FA.

Ve druhé fázi experimentu v laboratorním modelu č. 2 byla opět patrná adaptace AOB na vysoké hodnoty FA a FNA. Koncentrace zaznamenané během této části experimentu jsou uvedeny na obr. 6 a 7. Je patrné, že koncentrace FA se pohybovaly v oblasti inhibičních mezí uváděných Anthonisem et al. (1976) pro AOB (10 – 150 mg/l FA), a to často i na konci cyklu. Rovněž koncentrace FNA přesahovaly inhibiční mez pro AOB dle Zhoua et al. (2011), kteří uvádí 50 % snížení aktivity AOB při koncentraci FNA v rozmezí 0,42–1,72 mg/l, a také dle Vadivela et al. (2006), kteří udávají, že FNA inhibuje AOB již v rozmezí 0,1 – 0,63 mg/l. Podobná pozorování byla zaznamenána také v jiných studiích. Např. Sun et al. (2013) zaznamenali aktivitu AOB při koncentraci FA vyšší než 50 mg/l a koncentraci FNA vyšší než 2 mg/l.



Obr. 6 – Koncentrace FA na začátku a na konci cyklu SBR během 2. fáze experimentu v laboratorním modelu č. 2



Obr. 7 – Koncentrace FNA na začátku a na konci cyklu SBR během 2. fáze experimentu v laboratorním modelu č. 2

4. 4. 2 Adaptační NOB

V kapitole 4. 1 bylo uvedeno, že během etap 1 – 3 experimentu v laboratorním modelu č. 1 bylo dosaženo stabilní zkrácené nitrifikace. Během etapy 5 ve stejném modelu

(postupné zvýšení vstupní koncentrace N-amon až na 1000 mg/l) se koncentrace FA postupně zvyšovala a dosáhla i vyšších hodnot než v etapách 1 - 3, ale k potlačení činnosti NOB již znovu nedošlo, ačkoli i koncentrace FNA se již pohybovala v rozmezí (viz obr. 1 a 3), kdy by k ní dle Zhoua et al. (2011) mělo docházet. Byla ovšem několikanásobně nižší než v dřívějších etapách experimentu, kdy byla činnost NOB potlačena – např. v etapě 2 koncentrace FNA dosahovala až 2 mg/l, zatímco v etapě 5 nepřesáhla 0,1 mg/l. Tato situace byla patrně dána adaptací NOB na vysoké koncentrace FA a FNA, které jsou při dlouhodobém provozu systému po určité době schopny snášet koncentrace FA i FNA nad limity uváděnými v literatuře. K podobným závěrům dospěli také Li et al. (2017) a An et al. (2021). Možnou adaptaci NOB na vysoké koncentrace FA a FNA je proto nutno brát v potaz při dlouhodobém provozu určitého systému především při čištění odpadních vod s nižšími vstupními koncentracemi N-amon. V odpadních vodách s vyššími vstupními koncentracemi totiž tento jev často pozorován není. Např. Švehla et al. (2014) zaznamenali v kalové vodě o vstupní koncentraci 970 – 1500 mg/l čištěné v režimu SBR při teplotě 23 ± 2 °C a při nelimitované koncentraci rozpuštěného kyslíku potlačení činnosti NOB po více než 700 dnů.

4.5 Význam získaných poznatků pro praxi

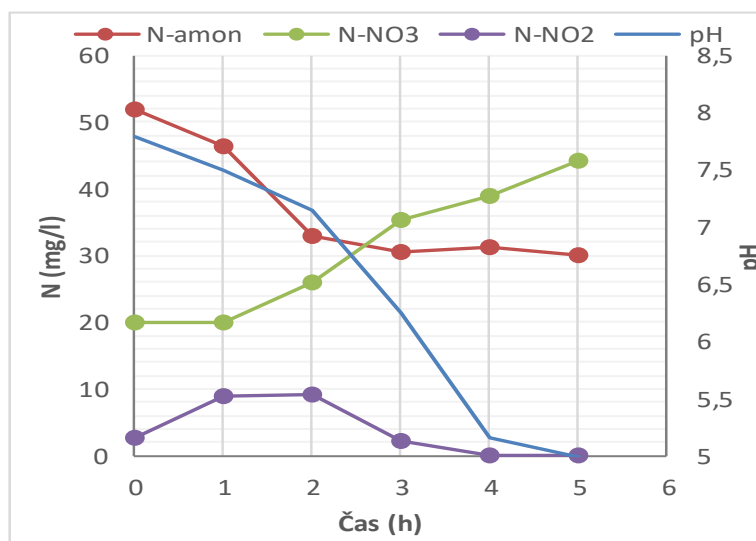
Poznatky z provedeného výzkumu jsou aplikovatelné především pro systémy využívající zkrácenou nitrifikaci pro zpracovávání kalové vody a odpadní vody podobného charakteru (např. skládkový výluh a fugát z bioplynových stanic). Realizované pokusy naznačují, že při čištění odpadních vod s vysokou koncentrací N-amon není nutné za určitých podmínek udržovat konstantní a vysokou teplotu, ale že systém může fungovat i při nižších teplotách, které mohou navíc v určitém rozmezí kolísat. To by bylo při využití v reálném provozu velmi výhodné z ekonomického hlediska, protože by nebylo nutné reaktor vyhřívat. Bylo navíc prokázáno, že je možné systém provozovat při výrazně kolísající teplotě při zatížení amoniakálním dusíkem dosahujícím až $1,5 \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$. Tento poznatek je pro praxi poměrně zajímavý, protože např. systém SHARON pracuje obvykle při zatížení do $1,0 \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ a při teplotě dosahující 30 – 40 °C (van Kempen et al. 2001; Lackner et al. 2014).

V laboratorním měřítku je nemožné dokonale simulovat přirozené kolísání teploty na ČOV, při experimentech simulujících náhlé teplotní změny bylo dosaženo požadované teploty za cca 4 hodiny, v reálném provozu by teplotní změny byly s největší pravděpodobností pozvolnější. Vzhledem k tomu, že výše popsáný systém na zpracování kalové vody byl v laboratorních podmínkách stabilnější při pozvolných změnách teploty než při náhlých, lze předpokládat, že v provozních či poloprovozních podmínkách by byl schopen tolerovat i o něco razantnější výkyvy v teplotě než při popsáných experimentech zaměřených na náhlé poklesy teploty.

Pro využití v praxi je rovněž důležitým poznatkem, že v době, kdy bylo v laboratorních modelech č. 1 a 2 dosaženo stabilní zkrácené nitrifikace (u laboratorního modelu č. 1 se jednalo o etapy 1 - 3, u laboratorního modelu č. 2 v etapě 1, 3, 5 a 7 v 1. fázi experimentu a po celou 2. fázi experimentu) se poměr $N-NO_2^-/N$ -amon pohyboval v rozmezí 0,8 – 1,1 což je výhodné pro případný následný ANAMMOX (van Dongen et al. 2001; Hendrickx et al. 2012). Výsledky výše posaných experimentů tak mohou najít využití zejména ve dvoukalovém PN/A systému. Poznatky z výzkumu se dají použít i pro optimalizaci postupu nitrifkace/denitrifkace, nicméně v takovém případě by za účelem optimalizace celkové účinnosti odstranění sloučenin dusíku bylo patrně nutné zvýšit účinnost nitrifkace např. regulací hodnoty pH (Torá et al. 2014).

Jak již bylo uvedeno, v laboratorním modelu č. 1 došlo po snížení vstupní koncentrace N-amon na 75 mg/l (4. etapa) k úplné nitrifikaci. Nicméně výsledky kinetického experimentu v etapě 4 (viz obr. 8), kdy již nebyla pozorována zkrácená nitrifikace, ukazují, že ke vzniku dusitanů v reaktoru během prvních 3 hodin cyklu SBR docházelo (koncentrace do 9,2 mg/l). To naznačuje možnost využití specifické strategie schopné v daných podmínkách v podstatě úplného potlačení aktivity NOB, která by vedla k dosažení zkrácené nitrifikace i ve vodách s nižší koncentrací N-amon (např. ve splaškových odpadních vodách) při dané teplotě. Jako slibné se v poslední době jeví zejména střídání aerobních a anoxických podmínek (Regmi et al. 2016) nebo regulace délky fází s provzdušňováním (Yang et al. 2007). Nutno ovšem podotknout, že výrazné výkyvy hodnot pH na začátku a na konci cyklu SBR a s nimi spojené dosažení koncentrací FA a FNA dostačujících k potlačení NOB v rámci výzkumu shrnutého v této práci jsou

dané především omezenou kyselinovou neutralizační kapacitou kalové vody při vysoké koncentraci N-amon, a to i po jejím naředění (Khin & Annachhatre 2004). Uplatnění výše uvedených poznatků je tak např. pro splaškové vody omezené, protože v nich by patrně k tak výrazným výkyvům pH během cyklu SBR nedocházelo (tudíž i výkyvy v koncentraci FA a FNA by byly méně intenzivní a jejich inhibiční účinek menší vzhledem k nižším maximálním dosahovaným koncentracím) i při stejné vstupní koncentraci N-amon.



Obr. 8 – Výsledky kinetického experimentu v laboratorním modelu č. 1 (4. etapa)

Velmi diskutovaným problémem jsou v současnosti emise oxidu dusného (N_2O) při čištění odpadních vod. Oxid dusný patří mezi skleníkové plyny a je produkován během nitrifikace i denitrifikace zejména při nízké koncentraci rozpuštěného kyslíku, při vysokých koncentracích dusitanů a při nízkém poměru CHSK/N během denitrifikace (Kampschreur et al. 2009; Pitter 2009). Množství emisí oxidu dusného na jednotlivých čistírnách odpadních vod je tak závislé na použití konkrétní technologie pro odstranění dusíkatého znečištění a na provozních podmínkách. Odhaduje se, že emise oxidu dusného z odpadních vod tvoří 4 – 5 % z celosvětové produkce tohoto plynu způsobené antropogenní činností (Płuciennik-Koropczuk & Myszograj, 2021). Vzhledem k charakteristickým vlastnostem systému aplikovaného v rámci výzkumu prezentovaného v této práci (nitrifikační, resp. nitritační, SBR systém pracující trvale při extrémně vysokých koncentracích $N-NO_2^-$ atd.), nelze na základě výše uvedených skutečností

vyločit zvýšenou produkci N₂O při jeho provozu. Studie zaměřená na vyhodnocení míry tohoto rizika se tedy jeví jako zajímavé téma pro navazující výzkum.

5 Závěr

Z výsledků experimentů provedených v rámci této práce lze vyvodit následující závěry:

- Byla potvrzena hypotéza, že změny fyzikálních a technologických parametrů při nitrifikaci povedou k významným změnám v aktivitě jednotlivých skupin nitrifikačních organismů (AOB, NOB).
- Při zpracování kalové vody je možné dosáhnout zkrácené nitrifikace i v podmínkách, které nejsou primárně výhodné pro AOB (nízká teplota, teplotní výkyvy), díky provozu v režimu SBR a s ním souvisejícímu inhibičnímu vlivu FA a FNA.
- Pro potlačení aktivity NOB při současném zachování funkce AOB mělo v daných podmínkách patrně větší význam inhibiční působení FNA než FA.
- Při dlouhodobém provozu systémů založených na dosažení zkrácené nitrifikace je nutno brát v úvahu potenciální adaptaci NOB (ale i AOB) na relativně vysoké koncentrace FA a FNA v reaktoru.
- Při čištění odpadních vod s vysokou koncentrací N-amon s využitím zkrácené nitrifikace není nutné za určitých podmínek udržovat konstantní a vysokou teplotu, ale systém může fungovat i při nižších teplotách, které mohou navíc v určitém rozmezí kolísat.
- Při postupném snižování teploty bylo stabilní zkrácené nitrifikace ve srovnání s náhlými teplotními poklesy dosaženo i při nižší teplotě.
- Při náhlých poklesech teploty z 24 na 17 °C byl systém využívající zkrácené nitrifikace pro zpracování kalové vody stabilní i při zatížení amoniakálním dusíkem až do 1,5 kg/(m³·d).
- Výsledky popsaného výzkumu se dají uplatnit zejména při čištění kalové vody, skládkového výluhu nebo fugátu z bioplynových stanic. Při provozu laboratorních

modelů v obdobích, kdy v nich bylo dosaženo stabilní zkrácené nitrifikace, byl poměr N-amon/N-NO₂⁻ cca kolem 1, který je ideální pro následný proces ANAMMOX.

- Prahová hodnota vstupní koncentrace N-amon, kdy je možno úspěšně a dlouhodobě udržet zkrácenou nitrifikaci, leží za výše popsaných podmínek patrně v rozmezí 75 – 150 mg/l. Pro dosažení zkrácené nitrifikace při zpracování vody s nižší vstupní koncentrací N-amon v režimu SBR je nutné využít kromě vlivu FA a FNA na aktivitu NOB specifickou strategii pro provoz systému (např. přerušovaná aerace apod.).

6 Seznam použité literatury

- Abelling U, Seyfried CF. 1992. Anaerobic – aerobic treatment of high – strength ammonium wastewater – nitrogen removal via nitrite. *Water Science and Technology* **26**:1007 – 1015.
- Ahn YH. 2006. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry* **41**:1709 – 1721.
- Achilleos P, Roberts KR, Williams ID. 2022. Struvite precipitation within wastewater treatment: A problem or a circular economy opportunity?. *Heliyon* **8**:(e09862) DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e09862.
- Akizuki S, Natori N, Cuevas-Rodríguez G, Toda T. 2020. Application of nitrifying granular sludge for stable ammonium oxidation under intensive light. *Biochemical Engineering Journal* **160**: (e107631) DOI: 10.1016/j.bej.2020.107631.
- Albaiges J, Casado F, Ventura F. 1986. Organic indicators of groundwater pollution by a sanitary landfill. *Water Research* **20**:1153–1159.
- Al-Hazmi HE, Hassa GK, Maktabifard M, Grubba D, Majtacz J, Mańkinia J. 2022. Integrating conventional nitrogen removal with anammox in wastewater treatment systems: Microbial metabolism, sustainability and challenges. *Environmental Research* **215**:(e114432) DOI: 10.1016/j.envres.2022.114432.
- Alleman JE. 1985. Elevated Nitrite Occurrence in Biological Wastewater Treatment Systems. *Water, Science and Technology* **17**:409–419.
- Ali M, Okabe S. 2015 Anammox-based technologies for nitrogen removal: advances in process start-up and remaining issues. *Chemosphere* **141**:144–153.
- Ambrožová J. 2003. Aplikovaná a technická hydrobiologie. Vydavatelství VŠCHT, Praha.
- An Z, Kent TR, Sun Y, Bott CB, Wang ZW. 2021. Free ammonia resistance of nitrite-oxidizing bacteria developed in aerobic granular sludge cultivated in continuous upflow airlift reactors performing partial nitrification. *Water Environment Research* **93**:421–432.

- Anthonisen AC, Loehr RC, Prakasam TBS, Srinath EG. 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal WPCF* **5**:835 - 852.
- Aslan S, Miller L, Dahab M. 2009. Ammonium oxidation via nitrite accumulation under limited oxygen concentration in sequencing batch reactors. *Bioresource Technology* **100**:659 – 664.
- Bae W, Baek S, Chung J, Lee Y. 2002. Optimal operational factors for nitrite accumulation in batch reactors. *Biodegradation*. 12: 359 – 366.
- Baun A, Ledin A, Reitzel LA, Bjerg PL, Christensen TH. 2004 Xenobiotic organic compounds in leachates from ten Danish MSW landfills – chemical analysis and toxicity tests. *Water Resources* **38**:3845–3858.
- Beckinghausen A, Odlare M, Thorin E, Schwede S. 2020. From removal to recovery: An evaluation of nitrogen recovery techniques from wastewater. *Applied Energy* **263**:(e114616) DOI: 10.1016/j.apenergy.2020.114616.
- Bhagowati B, Ahamad KU. 2019. A review on lake eutrophication dynamics and recent developments in lake modeling. *Ecology and Hydrobiology* **19**:155–166.
- Blackburne R, Yuan Z, Keller J. 2007. Partial nitrification to nitrite using low dissolved oxygen concentration as the main selection factor. *Biodegradation* **19**:303–312.
- Blackburne R, Yuan Z, Keller J. 2008. Demonstration of nitrogen removal via nitrite in a sequencing batch reactor treating domestic wastewater. *Water Research* **42**:2166 – 2176.
- Buday J, Drtil M, Hutňan M, Derco J. 1999. Substrate and product inhibition of nitrification. *Chemical Papers* **53**:379–383.
- Cai T, Park Y, Li Y. 2013. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **19**:360–369.

- Cao Y, van Loosdrecht MCM, Daigger GT. 2017 Mainstream partial nitritation-anammox in municipal wastewater treatment: status, bottlenecks, and further studies. *Applied Microbiology and Biotechnology* **101**:1365–1383.
- Ciudad G, Rubilar O, Muñoz P, Ruiz G, Chamy R, Vergara C, Jeison D. 2005. Partial nitrification of high ammonia concentration wastewater as a part of a shortcut biological nitrogen removal process. *Process Biochemistry* **40**:1715 – 1719.
- Claros J, Jiménez E, Aguado D, Ferrer J, Seco A, Serralta J. 2013. Effect of pH and HNO₂ concentration on the activity of ammonia-oxidizing bacteria in a partial nitritation reactor. *Water Science and Technology* **67**:2587 – 2594.
- Connan R, Dabert P, Moya-Espinosa M, Bridoux G, Beline F, Magri A. 2018. Coupling of partial nitritation and anammox in two- and one-stage systems: Process operation, N₂O emission and microbial community. *Journal of Cleaner Production* **203**:559–573.
- Daims H, Lebedeva EV, Pjevac P, Han P, Herbold C, Albertsen M, Jehmlich N, Palatinszky M, Vierheilig J, Bulaev A, Kirkegaard RH, von Bergen M, Rattei T, Bendinger B, Nielsen PH, Wagner M. 2015. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature* **528**:504–509.
- Dijkman H., Strous M. 1999. Process for ammonia removal from wastewater. The Patent Cooperation Treaty, Nizozemí. PCT/NL99/00446.
- Dittmann E, Fewer DP, Neilan BA. 2013. Cyanobacterial toxins: Biosynthetic routes and evolutionary roots. *FEMS Microbiology Reviews* **37**:23–43.
- Dohányos M, Koller J, Strnadová N. 1998. Čištění odpadních vod. Vydavatelství VŠCHT, Praha.
- Du R, Cao S, Li B, Niu M, Wang S, Peng Y. 2017. Performance and microbial community analysis of a novel DEAMOX based on partial-denitrification and anammox treating ammonia and nitrate wastewaters. *Water Research* **108**:46–56.

- Duan H, Ye L, Lu X, Yuan Z. 2019. Overcoming nitrite oxidizing bacteria adaptation through alternating sludge treatment with free nitrous acid and free ammonia. *Environmental Science & Technology* **53**:1937–1946.
- Erguder TH, Boon N, Vlaeminck SE, Verstraete W. 2008. Partial nitrification achieved by pulse sulphide doses in a sequential batch reactor, *Environmental Science & Technology* **42**:8715–8720.
- Fux C, Siegrist H. 2004. Nitrogen removal from sludge digester liquids by nitrification/denitrification or partial nitrification/anammox: environmental and economical considerations. *Water Science and Technology* **50**:19–26.
- Gabarro J, Ganigue R, Gich F, Rusalleda M, Balaguer MD, Colprim J. 2012. Effect of temperature on AOB activity of a partial nitrification SBR treating landfill leachate with extremely high nitrogen concentration. *Bioresource Technology* **126**:283–289.
- García-Ruiz M, Castellano-Hinojosa A, González-López J, Osorio F. 2018. Effects of salinity on the nitrogen removal efficiency and bacterial community structure in fixed-bed biofilm CANON bioreactors. *Chemical Engineering Journal* **347**:156–164.
- Gao JL, He YL, Chys M, Decostere B, Audenaert WTM, Van Hull SWH. 2014. Autotrophic nitrogen removal of landfill leachate at lab-scale and pilot-scale: feasibility and cost evaluation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **90**: 2152–2160.
- Gao X, Zhang Q, An Z, Shao B, Peng Y. 2023. Municipal wastewater treatment with limited carbon sources: The significance and advantages of transformation from partial denitrification to partial nitrification coupling with anammox. *Resources, Conservation & Recycling* **198**:(e107185) DOI:10.1016/j.resconrec.2023.107185.
- Gonzalez-Martinez A, Muñoz-Palazon B, Rodriguez-Sanchez A, Gonzalez-Lopez J. 2018. New concepts in anammox processes for wastewater nitrogen removal: recent advances and future prospects. *FEMS Microbiology Letters* **365**:1–10.

- Greer FR, Shannon M. 2005. Infant methemoglobinemia: the role of dietary nitrate in food and water. *Pediatrics* **116**:784–786.
- Gu W, Wang L, Liu Y, Liang P, Zhang X, Li Y, Huang X. 2020. Anammox bacteria enrichment and denitrification in moving bed biofilm reactors packed with different buoyant carriers: performances and mechanisms. *Science of the Total Environment* **719**:(e137277) DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.137277.
- Guo H, He T, Chang JS, Liu P, Lee DJ. 2022. Nitrogen removal from low C/N wastewater in a novel Sharon&DSR (denitrifying sulfide removal) reactor. *Bioresource Technology* **362**:127789 DOI: 10.1016/j.biortech.2022.127789.
- Guo H, Chen C, Lee DJ. 2020. Manipulating denitrifying sulfide removal of *Pseudomonas* sp. C27 with nitrite as sole nitrogen source: Shotgun proteomics analysis. *Bioresource Technology* **318**: 124074 DOI: 10.1016/j.biortech.2020.124074.
- Guo X, Chen J, Wang X, Li Y, Liu Y, Jiang B. 2023. Sustainable ammonia recovery from low strength wastewater by the integrated ion exchange and bipolar membrane electrodialysis with membrane contactor system. *Separation and Purification Technology* **305**:122429 DOI: 10.1016/j.seppur.2022.122429.
- Gustavsson DJI, Suarez C, Wilen BM, Hermansson M, Persson F. 2020. Long-term stability of partial nitrification-anammox for treatment of municipal wastewater in a moving bed biofilm reactor pilot system. *Science of the Total Environment* **714**:(e136342) DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.136342.
- Gustavsson D, Syd V, Malmo S. 2010. Biological sludge liquor treatment at municipal wastewater treatment plants-a review. *Vatten* **66**:179–192.
- Guven D, Dapena A, Kartal B, Schmid MC, Maas B, van de Pas-Schoonen K, Sozen S, Mendez R, Op den Camp HJM, Jetten MSM, Strous M, Schmidt I. 2005. Propionate oxidation by and methanol inhibition of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:1066–1071.

- Han XY, Zhang SJ, Yang SH, Zhang L, Peng YZ. 2020. Full-scale partial nitritation/anammox (PN/A) process for treating sludge dewatering liquor from anaerobic digestion after thermal hydrolysis. *Bioresource Technology* **297**:122380 DOI: 10.1016/j.biortech.2019.122380.
- Hao X, Heijnen J, van Loosdrecht MCM. 2002. Model-based evaluation of temperature and inflow variations on a partial nitrification-ANAMMOX biofilm process. *Water Research* **19**:4839–4849.
- Hellinga C, Schellen AAJC, Mulder JW, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ. 1998. The SHARON process: An innovative method for nitrogen removal from ammoniumrich waste water. *Water Science and Technology* **37**:135 – 142.
- Hendrickx TLG, Wang Y, Kampman C, Zeeman G, Temmink H, Buisman CJN. 2012. Autotrophic nitrogen removal from low strength waste water at low temperature. *WaterResearch*, **46**:2187–2193.
- Henze M, van Loosdrecht MCM, Ekama G, Brdjanovic D. 2008. *Biological wastewater treatment: principles, modelling and design*. IWA Publishing, London.
- Hu Z, Chandran K, Grasso D, Smets BF. 2003. Impact of metal sorption and internalization on nitrification inhibition. *Environmental Science & Technology* **37**:728 - 734.
- Huang XW, Sun KH, Wei QY, Urata K, Yamashita Y, Hong N, Hama T, Kawagoshi Y. 2016. One-stage partial nitritation and anammox in membrane bioreactor, *Environmental Science and Pollution Research* **23**:11149–11162.
- Hwang SJ. 2020. Eutrophication and the Ecological Health Risk. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **17**: (e 6332) DOI: 10.3390/ijerph17176332.
- Chen C, Ho KL, Liu FC, Ho M, Wang A, Ren N, Lee DJ. 2013. Autotrophic and heterotrophic denitrification by a newly isolated strain *Pseudomonas* sp. C27. *Bioresource Technology* **145**:351–356.

- Chen F, Cheng H, Qian Y, Shen J, Zhao W, Qin Y, Li YY. 2024. Improved performance of single-stage partial nitrification-anammox membrane bioreactor (PN/A MBR) by adding biofilm carriers: start-up, membrane operation and microbial structure. *Chemical Engineering Journal* **480**: (e148112) DOI: 10.1016/j.cej.2023.148112.
- Chen R, Ji J, Chen Y, Takemura Y, Liu Y, Kubota K, Ma H, Li Y. 2019. Successful operation performance and syntrophic micro-granule in partial nitrification and anammox reactor treating low-strength ammonia wastewater. *Water Research* **155**:288–299.
- Chen G, Li J, Wei J, Zeng J, Zhang Y, Bian W, Deng H. 2016. Nitrification via heat shock using immobilized active sludge aggregates. *Desalination and Water Treatment* **57**:22779-22787.
- Chen H, Liu S, Yang F, Xue Y, Wang T. 2009. The development of simultaneous partial nitrification, ANAMMOX and denitrification (SNAD) process in a single reactor for nitrogen removal, *Bioresource. Technology* **100**:1548–1554.
- Chen H, Tu Z, Wu S, Yu GL, Du CY, Wang H, Yang EZ, Zhou L, Deng B, Wang DB, Li HL. 2021. Recent advances in partial denitrification-anaerobic ammonium oxidation process for mainstream municipal wastewater treatment. *Chemosphere* **278**:(e130436) DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.130436.
- Chmielewska E. 2005. Alternatívne spôsoby úpravy a čistenia odpadových vôd. *Odpady* **5**:11 – 17.
- Chudoba J, Dohányos M, Wanner J. 1991. *Biologické čištění odpadních vod*. Státní nakladatelství technické literatury, Praha.
- Isanta E, Reino C, Carrera J, Perez J. 2015. Stable partial nitrification for low-strength wastewater at low temperature in an aerobic granular reactor. *Water Research* **80**:149–158.
- Jenicek P, Svehla P, Zabranska J, Dohanyos M. 2004. Factors affecting nitrogen removal by nitrification/denitrification. *Water Science and Technology* **5–6**:73–79.

- Jetten MSM, Strous M, van de Pas-Schoonen KT, Schalk J, van Dongen UGJM, van De Graaf AA, Logemann S, Muyzer G, van Loosdrecht MCM, Kuenen JG. 1999. The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiology Reviews* **22**:421- 437.
- Jia W, Zhang J, Lu Y, Li G, Yang W, Wang Q. 2018. Response of nitrite accumulation and microbial characteristics to low-intensity static magnetic field during partial nitrification. *Bioresource Technology* **259**:214–220.
- Jiang CH, Tang X, Feng F, Zhao J, Liou Č, Qu C, Keshab K. 2022. Distinct membrane fouling characteristics of anammox MBR with low NO_2^- -N/ NH_4^+ -N ratio. *Science of the Total Environment* 817:(e152994) DOI:10.1016/j.scitotenv.2022.152994.
- Jin X, Rong N, Zhang W, Meng X, Shan B. 2019. Bioavailability of organic phosphorus in an eutrophic lake: insights from an in-situ experiment. *Ecological Indicators* **107**: (e105622) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105622>.
- Jin RC, Yang GF, Yu JJ, Zheng P. 2012. The inhibition of the Anammox process: A review. *Chemical Engineering Journal* **197**:67–79.
- Kampschreur MJ, Temmink H, Kleerebezem R, Jetten MS, van Loosdrecht MC. 2009 Nitrous oxide emission during wastewater treatment. *Water Research* **43**: 4093 – 4103.
- Karmann Ch, Magrovova A, Jenicek P, Bartacek J, Kouba V. 2024. Advances in nitrogen removal and recovery technologies from reject water: Economic and environmental perspectives. *Bioresource Technology* **391**:(e129888) DOI: 10.1016/j.biortech.2023.129888.
- Khamidun MH, Fulazzaky MA, Al-Gheethi A, Ali UFM, Muda K, Hadibarata T, Razi MAM. 2020. Adsorption of ammonium from wastewater treatment plant effluents onto the zeolite; A plug-flow column, optimisation, dynamic and isotherms studies. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **102**:8445-8466.
- Khin T, Annachatre AP. 2004. Novel Microbial Nitrogen Removal Processes. *Biotechnology Advances* **22**:519–532.

- Kim JH, Guo X, Park HS. 2008. Comparison study of the effects of temperature and free ammonia concentration on nitrification and nitrite accumulation. *Process Biochemistry* **43**:154 – 160.
- Kornaros M, Dokianakis SN, Lyberatos G. 2010. Partial nitrification/denitrification can be attributed to the slow response of nitrite oxidizing bacteria to periodic anoxic disturbances. *Environmental Science & Technology* **44**:7245–7253.
- Kosgey K, Chandran K, Gokal J, Kiambi SL, Bux F, Kumari S. 2021. Critical analysis of biomass retention strategies in mainstream and sidestream ANAMMOX-mediated nitrogen removal systems. *Environmental Science & Technology* **55**:9–24.
- Kouba V, Catrysse M, Stryjova H, Jonatova I, Volcke EIP, Svehla P, Bartacek, J. 2014. The impact of influent total ammonium nitrogen concentration on nitrite oxidizing bacteria inhibition in moving bed biofilm reactor. *Water Science and Technology* **69**:1227–1233.
- Kouba V, Proksova E, Wiesinger H, Vejmelkova D, Bartacek J. 2017. Good servant, bad master: sulphide influence on partial nitritation of sewage. *Water Science and Technology* **76**:3258–3268.
- Kouba V, Svehla P, Catrysse M, Prochazkova L, Radechovska H, Jenicek P, Bartacek J. 2019. How biomass growth mode affects ammonium oxidation start-up and NOB inhibition in the partial nitritation of cold and diluted reject water. *Environmental Technology* **40**:673 – 682.
- Kouba V, Vejmelkova D, Proksova E, Wiesinger H, Concha M, Dolejs P, Hejnic J, Jenicek P, Bartacek J. 2017. Highrate partial nitritation of municipal wastewater after psychrophilic anaerobic pretreatment. *Environmental Science & Technology* **51**:11029–11038.
- Kuai LP, Verstraete W. 1998. Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system. *Applied and Environmental Microbiology* **64**:4500–4506.

- Kumwimba MN, Lotti T, Şenel E, Li X, Suanon F. 2020. Anammox-based processes: how far have we come and what work remains? A review by bibliometric analysis. *Chemosphere* **238**:(e124627) DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.124627.
- Kundu S, Pramanik BK, Halder P, Patel S, Ramezani M, Khairul MA, Marzbali MH, Paz-Ferreiro J, Crosher S, Short G, Surapaneni A, Bergmann D, Shah K. 2022. Source and central level recovery of nutrients from urine and wastewater: A state-of-art on nutrients mapping and potential technological solutions. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **10**:(e107146) DOI: 10.1016/j.jece.2022.107146.
- Lackner S, Gilbert EM, Vlaeminck SE, Joss A, Horn H, van Loosdrecht MCM. 2014. Full-scale partial nitrification/anammox experiences - an application survey. *Water Research* **55**:292–303.
- Li B, Boiarkina I, Yu W, Huang HM, Munir T, Wang GQ, Young BR. 2019. Phosphorous recovery through struvite crystallization: Challenges for future design. *Science of the Total Environment* **648**:1244-1256.
- Li B, Godfrey BJ, RedCorn R, Candry P, Abrahamson B, Wang Z, Goel R, Mari-K.H. Winkler MKH. 2023. Mainstream nitrogen removal from low temperature and low ammonium strength municipal wastewater using hydrogel-encapsulated comammox and anammox, *Water Research* **242**:(e120303) DOI: 10.1016/j.watres.2023.120303.
- Li Y, Wang Z, Li J, Wei J, Zhang, Y, Zhao B. 2017. Inhibition kinetics of nitrification and half-nitrification of old landfill leachate in a membrane bioreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **123**:482-488.
- Li Z, Zhang ZH, Zhang Z. 2011. Inhibition of nitrification of ammonia-rich wastewater in immobilized nitrifiers system. *Advanced Materials Research* **183-185**:197–200.
- Li X, Zhang J, Zhang X, Li J, Liu F, Chen Y. 2019. Start-up and nitrogen removal performance of CANON and SNAD processes in a pilot-scale oxidation ditch reactor. *Process Biochemistry* **84**:134 – 142.

- Liu Y, Zhu Y, Wu D, Wang Z, Wang Y, Wang G, Zhou X, Sun H. 2023. Effect of free nitrous acid on nitrification process: Microbial community, inhibitory kinetics, and functional biomarker. *Bioresource Technology* **371**:(e128595) DOI: 10.1016/j.biortech.2023.128595.
- Ma B, Lan Y, Wang Q, Yuan Z, Peng Y. 2017. Inactivation and adaptation of ammonia-oxidizing bacteria and nitrite-oxidizing bacteria when exposed to free nitrous acid. *Bioresource Technology* **245**:1266–1270.
- Ma YW, Sundar S, Park HK, Chandran K. 2015b. The effect of inorganic carbon on microbial interactions in a biofilm nitrification-anammox process. *Water Research* **70**:246–254.
- Ma B, Wang SY, Cao SB, Miao YY, Jia FX, Du R, Peng YZ. 2015a. Biological nitrogen removal from sewage via anammox: recent advances. *Bioresource Technology* **200**:981–990.
- Mehta CM, Khunjar WO, Nguyen V, Tait S, Batstone DJ. 2015. Technologies to Recover Nutrients from Waste Streams: A Critical Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **45**:385-427.
- Okabe S, Oshiki M, Takahashi Y, Satoh H. 2011. Development of long-term stable partial nitrification and subsequent anammox process. *Bioresource Technology* **102**:6801–6807.
- Owaes M, Gani KM, Kumari S, Seyam M, Bux F. 2023. Achieving partial nitrification by harnessing basic hydrolysis of sulphide salts amid high dissolved oxygen conditions. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **11**: (e111000) DOI: 10.1016/j.jece.2023.111000.
- Pacek L. 2014. Biologické postupy čištění odpadních vod založené na cíleném hromadění dusitanů [MSc. Thesis]. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.

- Pambrun V, Paul L, Spérandio M. 2008. Control and modelling of partial nitrification of effluents with high ammonia concentrations in sequencing batch reactor. *Chemical Engineering and Processing* **47**:323 – 329.
- Pedrouso A, Aiartza I, Morales N, Vazquez-Padín J, Rogalla F, Campos J, Mosquera-Corral A, Val del Rio A. 2018. Pilot-scale ELAN ® process applied to treat primary settled urban wastewater at low temperature via partial nitrification-anammox processes. *Separation and Purification Technology* **200**:94–101.
- Perera MK, Englehardt JD, Dvorak AC. 2019. Technologies for Recovering Nutrients from Wastewater: A Critical Review. *Environmental Engineering Science* **36**:(e0436) DOI: 10.1089/ees.2018.0436.
- Phanwilai S, Kangwannarakul N, Noophan P, Kasahara T, Terada A, Munakata- Marr J, Figueroa LA. 2020. Nitrogen removal efficiencies and microbial communities in full-scale IFAS and MBBR municipal wastewater treatment plants at high COD:N ratio. *Frontiers of Environment Science & Engineering* **14**:(e11783) DOI: 10.1007/s11783-020-1374-2
- Pinelli D, Foglia A, Fatone F, Papa E, Maggetti C, Bovina S, Frascari D. 2022. Ammonium recovery from municipal wastewater by ion exchange: Development and application of a procedure for sorbent selection. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **10**:(e108829) DOI: 10.1016/j.jece.2022.108829.
- Pitter P. 2009. *Hydrochemie*. Vydavatelství VŠCHT, Praha.
- Pluciennik- Koropczuk E, Myszograj S. 2021. Significance of wastewater treatment to nitrous oxide emission. *Civil and Environmental Engineering* **31**: 0237 – 0248.
- Preisner P, Neverová-Dziopak E, Kowalewski Z. 2020. Analysis of eutrophication potential of municipal wastewater. *Water Science & Technology* **81**:194 – 2003.
- Pynaert K, Smets BF, Beheydt D, Verstraete W. 2004. Start-up of autotrophic nitrogen removal reactors via sequential biocatalyst addition. *Environmental Science & Technology* **38**: 1228–1235.

- Rada Evropské unie. 1991. Směrnice Rady 91/271/EHS ze dne 21. května 1991 o čištění městských odpadních vod. Pages 40 – 52 in Úřední věstník L 135, Česká republika.
- Rahimi S, Modin O, Mijakovic I. 2020. Technologies for biological removal and recovery of nitrogen from wastewater. *Biotechnology Advances* 43:(e107570). DOI: 10.1016/j.biotechadv.2020.107570.
- Regmi P, Holgate B, Fredericks D, Miller MW, Wett B, Murthy S, Bott CB. 2015. Optimization of a mainstream nitrification–denitrification process and anammox polishing. *Water Science and Technology* 72:632 – 642.
- Reino C, Carrera J. 2021. Impact of the nitrifying community dynamics on the partial nitrification process performed by an AOB-enriched culture in a granular sludge airlift reactor. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 9:(e106691) DOI: 10.1016/j.jece.2021.106691.
- Ren HT, Liang Y, Han X, Liu Y, Wu SH, Bai H, Jia SY. 2020. Photocatalytic oxidation of aqueous ammonia by Ag₂O/TiO₂ (P25): New insights into selectivity and contributions of different oxidative species. *Applied Surface Science* 504:(e144433) DOI: 10.1016/j.apsusc.2019.144433.
- Ren Y, Ngo HH, Guo W, Wang D, Peng L, Ni BJ, Wei W, Liu Y. 2020. New perspectives on microbial communities and biological nitrogen removal processes in wastewater treatment systems. *Bioresource Technology* 297:(e122491). DOI: 10.1016/j.biortech.2019.122491.
- Ren S, Wang Z, Jiang H, Qiu JG, Li XY, Zhang Q, Peng YZ. 2021. Stable nitrification of mature landfill leachate via in-situ selective inhibition by free nitrous acid. *Bioresource Technology* 340:(e125647).
- Ricklefs RE, Miller GL. 1999. *Ecology: fourth edition*. Freeman and co., New York.
- Rodríguez DC, Pino N, Peñuela G. 2011. Monitoring the removal of nitrogen by applying a nitrification–denitrification process in a sequencing batch reactor (SBR). *Bioresource Technology* 102:2316 – 2321.

- Rodriguez-Sanchez A, Gonzalez-Martinez A, Martinez-Toledo MV, Garcia-Ruiz MJ, Osorio F, Gonzalez-Lopez J. 2014. The Effect of Influent Characteristics and Operational Conditions over the Performance and Microbial Community Structure of Partial Nitrification Reactors. *Water* **6**:1905–1924.
- Shao YH, Wu JH. 2021. Comammox nitrospira species dominate in an efficient partial nitrification–anammox bioreactor for treating ammonium at low loadings. *Environmental Science & Technology* **55**:2087–2098.
- Show KY, Lee DJ, Pan XL. 2013. Simultaneous biological removal of nitrogen-sulfur-carbon: Recent advances and challenges. *Biotechnology Advances* **31**:409–420.
- Silva J, Gonçalves JC, Rocha C, Vilaça J, Madeira LM. 2024. Biomethane production from biogas obtained in wastewater treatment plants: Process optimization and economic analysis. *Renewable Energy* **220**:(e119469) DOI: 10.1016/j.renene.2023.119469.
- Singh V, Ormeci B, Mishra S, Hussain A. 2022. Simultaneous partial Nitrification, ANAMMOX and denitrification (SNAD) – A review of critical operating parameters and reactor configurations. *Chemical Engineering Journal* **433**:(e133677) DOI: 10.1016/j.cej.2021.133677.
- Soliman M, Eldyasti A. 2018. Ammonia-Oxidizing Bacteria (AOB): Opportunities and applications—A review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **17**:285–321.
- Statiris E, Dimopoulos T, Petalas N, Noutsopoulos C, Mamais D, Malamis S. 2022. Investigating the long and short-term effect of free ammonia and free nitrous acid levels on nitrification biomass of a sequencing batch reactor treating thermally pre-treated sludge reject water. *Bioresource Technology* **362**:(e127760) DOI: 10.1016/j.biortech.2022.127760.
- Su H, Zhang D, Antwi P, Xiao L, Liu Z, Deng X, Asumadu-Sakyi AB, Li J. 2020. Effects of heavy rare earth element (yttrium) on partial-nitrification process, bacterial activity and

- structure of responsible microbial communities. *Science of the Total Environment* **705**:(e135797) DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.135797.
- Sun HW, Bai Y, Peng YZ, Xie HG, Shi XN. 2013. Achieving nitrogen removal via nitrite pathway from urban landfill leachate using the synergetic inhibition of free ammonia and free nitrous acid on nitrifying bacteria activity. *Water Science and Technology* **9**:2035–2041.
- Svehla P, Bartacek J, Pacek L, Hrcirova H, Radechovsky J, Hanc A, Jenicek P. 2014. Inhibition effect of free ammonia and free nitrous acid on nitrite-oxidising bacteria during sludge liquor treatment: influence of feeding strategy. *Chemical Papers* **68**:871 – 878.
- Švehla P. 2004. Oddělené biologické čištění kalové vody [MSc. Thesis]. Vysoká škola chemicko - technologická v Praze, Praha.
- Tian S, Huang S, Zhu Y, Zhang G, Lian J, Liu Z, Zhang L, Qin X. 2021. Effect of low-intensity ultrasound on partial nitrification: Performance, sludge characteristics, and properties of extracellular polymeric substances. *Ultrasonics Sonochemistry* **73**:(e105527) DOI: 10.1016/j.ultsonch.2021.105527.
- Torá JA, Lafuente J, Garcia-Belinchón C, Bouchy L, Carrera J, Baeza JA. 2014. High-throughput nitrification of reject water with a novel ammonium control loop: stable effluent generation for anammox or heterotrophic denitrification. *Chemical Engineering Journal* **24**:265–271.
- Vadivelu VM, Yuan ZG, Fux C, Keller J. 2006. The inhibitory effects of free nitrous acid on the energy generation and growth processes of an enriched *Nitrobacter* culture. *Environmental Science & Technology* **40**:4442 - 4448.
- van Dongen LGJM, Jetten MSM, van Loosdrecht MCM. 2001. The combined Sharon/Anammox Process. A sustainable method for N-removal from sludge water. IWA Publishing, London.

- van Haandel A, van der Lubbe J. 2007. Handbook of Biological Waste Water Treatment. IWA Publishing, Leidschendam.
- van Kessel MAHJ, Stultiens K, Slegers MFW. 2018. Current perspectives on the application of N-damo and anammox in wastewater treatment. *Current Opinion in Biotechnology* **50**:222–227.
- van Tendeloo M, Xie Y, van Beeck W, Zhu W, Lebeer S, Vlaeminck SE. 2021. Oxygen control and stressor treatments for complete and long-term suppression of nitrite-oxidizing bacteria in biofilm-based partial nitrification/anammox. *Bioresource Technology* **342**:(e125996) DOI: 10.1016/j.biortech.2021.125996.
- Vela JD, Dick GJ, Love NG. 2018. Sulphide inhibition of nitrite oxidation in activated sludge depends on microbial community composition. *Water Research* **138**:241–249.
- Volcke EIP, Locuffier M, Vanrolleghem PA, Noldus EIJL. 2006. Existence, uniqueness and stability of the equilibrium points of a SHARON bioreactor model. *Journal of Process Control* **16**:1003 – 1012.
- Wan X, Baeten JE, Volcke EI. 2019. Effect of operating conditions on N₂O emissions from one-stage partial nitrification-anammox reactors. *Biochemistry Engineering Journal* **143**:24–33.
- Wang J, Liang J, Ning D, Zhang T, Wang M. 2022. A review of biomass immobilization in anammox and partial nitrification/ anammox systems: Advances, issues, and future perspectives. *Science of the Total Environment* **821**:(e152792) DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.152792.
- Wang J, Liu Y, Li W. 2020. Model-based assessment of nitrification using formic acid as a selective inhibitor. *Journal of Cleaner Production* **276**:(e124290) DOI: 10.1016/j.jclepro.2020.124290.
- Wang L, Qiu S, Guo J, Ge S. 2021. Light Irradiation Enables Rapid Start-Up of Nitrification through Suppressing nxrB Gene Expression and Stimulating Ammonia-Oxidizing Bacteria. *Environmental Science & Technology* **55**:13297–13305.

- Wang DB, Wang QL, Laloo A, Xu YF, Bond PL, Yuan ZG. 2016. Achieving stable nitritation for mainstream deammonification by combining free nitrous acid-based sludge treatment and oxygen limitation. *Scientific Reports* **6**:1–10.
- Wang Q, Ye L, Jiang G, Hu S, Yuan Z. 2014a. Side-stream sludge treatment using free nitrous acid selectively eliminates nitrite oxidizing bacteria and achieves the nitrite pathway. *Water Research* **55**:245–255.
- Wang L, Zeng G, Yang Z, Luo L, Xu H, Huang J. 2014b. Operation of partial nitrification to nitrite of landfill leachate and its performance with respect to different oxygen conditions. *Biochemical Engineering Journal* **23**:212–221.
- Wang Z, Zheng M, Duan H, Yuan Z, Hu S. 2022. A 20-year journey of partial nitritation and anammox (PN/A): from sidestream toward mainstream. *Environmental Science & Technology* **56**:7522 – 7531.
- Ward MH, deKok TM, Levallois P, Brender J, Gulis G, Nolan BT, VanDerslice J. 2005. Workgroup report: drinking-water nitrate and health—recent findings and research needs. *Environmental Health Perspectives* **113**:1607–1614.
- Winkler MKH, Straka L. 2019. New directions in biological nitrogen removal and recovery from wastewater. *Current Opinion in Biotechnology* **57**:50-55.
- Wu J, Kong Z, Luo Z, Qin Y, Rong C, Wang T, Hanaoka T, Sakemi S, Ito M, Kobayashi S. 2021. A successful start-up of an anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) coupled mainstream partial nitritation-anammox (PN/A) system: A pilot-scale study on in-situ NOB elimination, AnAOB growth kinetics, and mainstream treatment performance. *Water Research* **207**:(e117783) DOI: 10.1016/j.watres.2021.117783.
- Xiang T, Gao D. 2019. Comparing two hydrazine addition strategies to stabilize mainstream deammonification: Performance and microbial community analysis. *Bioresource Technology* **289**: (e121710) DOI: 10.1016/j.biortech.2019.121710.

- Xu G, Xu X, Yang F, Liu S, Gao Y. 2012. Partial nitrification adjusted by hydroxylamine in aerobic granules under high DO and ambient temperature and subsequent Anammox for low C/N wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal* **213**:338–345.
- Yamamoto T, Takaki K, Koyama T, Furukawa K. 2008. Long-term stability of partial nitritation of swine wastewater digester liquor and its subsequent treatment by Anammox. *Bioresource Technology* **99**:6419–6425.
- Yang Q, Peng YZ, Liu XH, Zeng W, Mino T, Satoh H. 2007. Nitrogen removal via nitrite from municipal wastewater at low temperatures using real-time control to optimize nitrifying communities. *Environmental Science & Technology* **41**:8159–8164.
- Yang S, Peng Y, Zhang L, Zhang Q, Li J, Wang X. 2019. Autotrophic nitrogen removal in an integrated fixed-biofilm activated sludge (IFAS) reactor: Anammox bacteria enriched in the flocs have been overlooked. *Bioresource Technology* **288**:(e121512) DOI: 10.1016/j.biortech.2019.121512.
- Yang J, Zhang L, Fukuzaki I, Hira D, Furukawa K. 2010. High-rate nitrogen removal by the Anammox process with a sufficient inorganic carbon source. *Bioresource Technology* **101**:9471 – 9478.
- Yang Y, Zhang L, Cheng J, Zhang S, Li X, Peng Y. 2018. Microbial community evolution in partial nitritation/anammox process: From sidestream to mainstream. *Bioresource Technology* **251**:327–333.
- Yao GJ, Ren JQ, Zhou F, Liu YD, Li W. 2021. Micro-nano aeration is a promising alternative for achieving high-rate partial nitrification. *Science of the Total Environment* **795**:(e148899) DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.148899.
- Zhan M, Zeng W, Wu C, Chen G, Meng Q, Hao X, Peng Y. 2024. Impact of organic carbon on sulfide-driven autotrophic denitrification: Insights from isotope fractionation and functional genes. *Water Research* **255**:(e121507) DOI: 10.1016/j.watres.2024.121507.

- Zhang JF, Lai ChY, Cao XX, Hartmann EM, Zhao HP. 2024. High ammonia loading rate and biofilm reattachment initiated partial nitrification and anammox in a membrane aerated biofilm reactor. *Journal of Water Process Engineering* **58**:(e104829) DOI: 10.1016/j.jwpe.2024.104829.
- Zhang Q, Xu X, Zhang R, Shao B, Fan K, Zhao L, Ji X, Ren N, Lee DJ, Chen Ch. 2022. The mixed/mixotrophic nitrogen removal for the effective and sustainable treatment of wastewater: From treatment process to microbial mechanism. *Water Research* **226**:(e119269). DOI: 10.1016/j.watres.2022.119269.
- Zhao H, Guo Y, Wang Q, Zhang Z, Wu C, Gao M, Liu F. 2022. The Summary of Nitritation Process in Mainstream Wastewater Treatment. *Sustainability* **14**:(e16453) DOI: 10.3390/su142416453.
- Zhou Y, Oehmen A, Lim M, Vadivelu V, Ng WJ. 2011. The role of nitrite and free nitrous acid (FNA) in wastewater treatment plants. *Water Research* **45**:4672–4682.
- Zhu L, Lv ML, Dai X, Yu YW, Qi HY, Xu XY. 2012. Role and significance of extracellular polymeric substances on the property of aerobic granule. *Bioresource Technology* **107**:46–54.
- Zhu G, Peng Y, Li B, Guo J, Yang Q. 2008. Biological Removal of Nitrogen from Wastewater. *Review of Environmental Contamination and Toxicology* **192**:159–195.